

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento Química Orgánica



## TESIS DOCTORAL

**Ligandos PPAR, líquidos iónicos y adamantanos como analgésicos y fármacos para el tratamiento del síndrome metabólico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Nieves Fresno López**

Directoras

Pilar Goya Laza  
Ruth Pérez Fernández

**Madrid, 2014**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Químicas

Departamento de Química Orgánica

LIGANDOS PPAR, LÍQUIDOS IÓNICOS Y  
ADAMANTANOS COMO ANALGÉSICOS Y  
FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO DEL  
SÍNDROME METABÓLICO.

Tesis Doctoral

Nieves Fresno López

# ***PPAR LIGANDS, IONIC LIQUIDS AND ADAMANTYL DERIVATIVES AS ANALGESICS AND FOR THE TREATMENT OF METABOLIC SYNDROME***

Nieves Fresno López

Supervisors: Pilar Goya Laza and Ruth Pérez Fernández

## **Introduction**

This PhD thesis has been carried out in the Instituto de Química Médica, CSIC and refers to the main research line of the IQM which deals with the design, synthesis and evaluation of new chemical entities as potential new drugs.

Different approaches have been used including “de novo” design based on the knowledge of the 3D structures of both the receptor and the ligands, and also the so called “analogue based” design.

The therapeutic targets chosen have been the nuclear PPAR receptors and the cannabinoid GPCR receptors which are involved in the metabolic syndrome, and also an ionic channel which can be modulated to produce analgesia.

In addition, ionic liquids have been prepared as a novel strategy to develop potential new drugs.

Therefore, the thesis is divided into three chapters:

## **Chapter 1. Synthesis and evaluation of new PPAR ligands and dual PPAR/CB ligands**

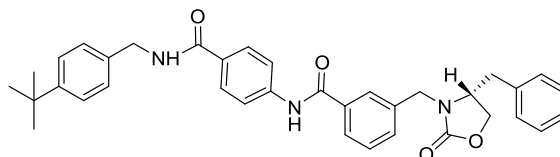
The peroxisome proliferator activated receptors PPARs were cloned in 1990 as orphan members of the nuclear receptor family. PPARs induce or repress transcription of a large number of different genes thereby influencing cellular functions. These receptors are considered master regulators of adipogenesis, lipid and glucose metabolism, energy balance and inflammation, making them ideal targets for the development of agents for treating diseases such as high levels of triglycerides, diabetes.. and in particular, metabolic syndrome.

Metabolic syndrome, MS, is a cluster of risk factors including abdominal obesity, dyslipidemia, insulin resistance and hypertension, the so-called deadly quartet, that increase of the risk of cardiovascular disease, CVD and type II diabetes, T2DM. MS remains one of the leading causes of mortality in western societies and a major public health challenge worldwide.

There are three known subtypes of PPAR receptors designated, alpha, gamma and beta/delta. While the three share a high level of sequence and structural homology, each type exhibits a unique tissue expression profile. PPAR alpha is highly expressed in brown adipose tissue, followed by liver, kidney, heart and skeletal muscle. PPAR gamma, is expressed predominantly in adipose tissue but also, at lower levels in heart, colon, etc... and also plays an important role in insulin sensitivity. The third subtype, remains the least understood, is expressed in many tissues and plays a role in the regulation of fatty acid catabolism and energy metabolism.

Drugs that activate PPARalpha and PPAR gamma have already been marketed. Among these, alpha agonists such as fenofibrate or gemfibrozil, are clinically used for the treatment of hyperlipidemia. Likewise, thiazolidindiones (TZDs) or glitazones, which are specific ligands for the gamma receptor, function as insulin sensitizers and are currently prescribed for controlling hyperglycemia in patients with T2DM.

In this thesis, we have synthesized and patented new PPAR agonists incorporating an oxazolidinone ring (Figure 1) For their design, we have taken into account the proposed agonist binding mode in the ligand binding domain, which is based on considerable crystallographic data.



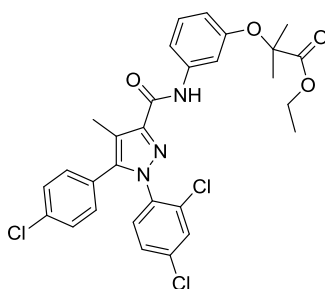
Compound 2

Figure 1. Example of PPAR alpha agonist.

For some compounds, we have found interesting *in vivo* and *in vitro* results, that is nanomolar affinity for the PPARalpha receptor and ability to reduce food intake in rats. Besides, we have performed docking studies of the new molecules in the LBD of the receptor.

These compounds are examples of the “one target one disease approach” with PPARs as targets for obesity. However, a recent trend in drug discovery is to develop agents that address, simultaneously, multiple drug targets that form part of the complex pathophysiology of a particular disease.

Following this strategy, we have prepared dual ligands integrating in one molecule the pharmacophore of the fibrates, fenofibrate (PPAR $\alpha$  agonist) and a structural motif of rimonabant, a proven CB1 antagonist/inverse agonist (Figure 2).



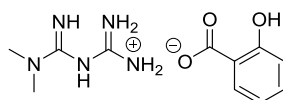
Compound 38

Figure 2. Example of dual PPAR/CB.

The dual ligands have been evaluated in both targets indicating that some of the compounds show affinity in the nanomolar range for both the PPAR and CB receptors.

## Chapter 2. Ionic liquids in medicinal chemistry

Ionic liquids derived from drugs represent a new strategy to deal with pharmacokinetic and solubility problems. Therefore, in this thesis, several ionic liquids formed by two APIs, active pharmacological ingredients, have been synthesized. Antinflammatory agents such as flurbiprofenate, anesthetics such as lidocaine or sweeteners such as saccharine have been used. The new compounds have been characterized by spectroscopic techniques mainly NMR, and in addition, calorimetric studies such as TGA and DSC have been performed. One of the compounds prepared is shown in Figure 3.



compound 69

Figure 3. Metformin salicylate example.

The preliminary biological evaluation of a derivative of metformin has been carried out.

## Chapter 3. Adamantyl analogs of paracetamol

Although acetaminophen also known as paracetamol has been used as an analgesic for more than a century, its mechanism of action is complex and the subject of continuous research mainly due to the extensive metabolism of acetaminophen in animals and humans. Despite the fact that it has been on the market for decades, acetaminophen can be considered a “standalone” drug of which no effective analogues are on the market.

In this thesis, we have described the synthesis and biological evaluation of new adamantyl analogues of acetaminophen with important analgesic properties (Figure 4). The mechanism of nociception is not exerted through direct interaction with cannabinoid receptors, nor by inhibiting COX. One of them behaves as an interesting selective TRPA1 channel antagonist, which may be responsible for its analgesic properties. *In vivo* experiments showed an analgesic efficacy significantly higher than acetaminophen and similar to morphine. Further studies are being carried out in order to gain a deep insight into the mechanism of these interesting derivatives.

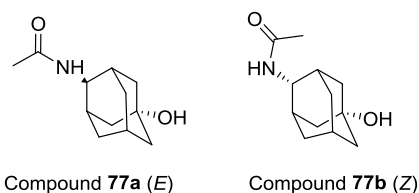


Figure 4. Adamantyl analogues of acetaminophen.

## ÍNDICE

### 1. SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVOS LIGANDOS PPAR Y LIGANDOS PPAR/CB

1.1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.1. SÍNDROME METABÓLICO.....	3
1.1.2. RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS (PPARs).....	15
1.1.3. RECEPTORES CANNABINOIDES.....	23
1.1.4. NUEVA PERSPECTIVA TERAPÉUTICA: DUALIDAD PPAR/CB.....	23
1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
1.2.1. DISEÑO DE LIGANDOS PPAR $\alpha$ y PPAR $\alpha/\gamma$ .....	27
1.2.1.1. Introducción y antecedentes.....	27
1.2.1.2. Síntesis.....	30
1.2.1.2.1. Síntesis de la serie 1.....	30
1.2.1.2.2. Síntesis de la serie 2.....	37
1.2.1.2.3. Síntesis de la Elaidilsulfamida <b>9</b> .....	40
1.2.1.3. Estudios de “docking”.....	41
1.2.1.4. Farmacología.....	48
1.2.2. DISEÑO DE LIGANDOS DUALES PPAR/CB.....	56
1.2.2.1 Síntesis de derivados 1,5 diarilpirazoles <b>36-46</b> .....	57
1.2.2.2. Estudios de “docking”.....	63
1.2.2.3. Evaluación farmacológica.....	67
1.3. CONCLUSIONES.....	74

1.4. PARTE EXPERIMENTAL.....	76
------------------------------	----

## 2. LÍQUIDOS IÓNICOS EN QUÍMICA MÉDICA

2.1. INTRODUCCIÓN.....	137
------------------------	-----

2.1.1. LÍQUIDOS IÓNICOS: ORIGEN Y EVOLUCIÓN.....	137
--	-----

### 2.1.2. LÍQUIDOS IÓNICOS DUALES

CON APLICACIONES TERAPÉUTICAS.....	141
------------------------------------	-----

2.1.2.1. LÍQUIDOS IÓNICOS A PARTIR DE APIS.....	143
---	-----

#### 2.1.2.2. LÍQUIDOS IÓNICOS:

PERMEABILIDAD BIOLÓGICAS.....	147
-------------------------------	-----

2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	149
----------------------------------	-----

2.2.1. SÍNTESIS DE ILs DUALES A PARTIR DE ÁCIDOS Y BASES DE BRONSTED.....	149
--	-----

2.2.2. CARACTERIZACIÓN DE ILs MEDIANTE DE TGA/DSC.....	156
--	-----

2.2.3. ENSAYOS WAXS.....	168
--------------------------	-----

2.2.4. CARACTERIZACIÓN POR RMN.....	171
-------------------------------------	-----

2.2.5 FARMACOLOGÍA.....	177
-------------------------	-----

2.3. CONCLUSIONES.....	180
------------------------	-----

2.4. EXPERIMENTAL.....	181
------------------------	-----

### 3. NUEVA APROXIMACIÓN EN ANALGESIA BASADA EN EL PARACETAMOL

3.1. INTRODUCCIÓN.....	207
3.1.1. EL DOLOR: DEFINICIÓN Y TRATAMIENTO.....	207
3.1.2. ANALGÉSICOS: PARACETAMOL.....	211
3.1.3. DERIVADOS DE ADAMANTANO EN QUÍMICA MÉDICA.....	217
3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	221
3.2.1 SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ADAMANTANO.....	222
3.2.2 FARMACOLOGÍA.....	226
3.3. CONCLUSIONES.....	234
3.4. PARTE EXPERIMENTAL.....	235



## ABREVIATURAS

Ac.	ácido
ACEA	araquidonil-2'-cloroetilamida
AcOEt	acetato de etilo
AcOH	ácido acético
ADN	ácido desoxirribonucleico
AINE	fármacos analgésicos antiinflamatorios
Al(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	trimetilaluminio
2-AG	2-araquidonilglicerol
Anal.	Análisis Elemental
APIs	Ingredientes farmacéuticos activos
c	cuadrupte
CB1	receptor cannabinoide tipo 1
CB2	receptor cannabinoide tipo 2
CBD	cannabidiol
CBN	cannabinol
CBZ	carbamazepina
CDCl <sub>3</sub>	cloroformo deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diclorometano
CH <sub>3</sub> CN	acetonitrilo
Co-A	co-activador
Co-R	co-represor
COX	enzima ciclooxigenasa
d	doblete
DML	diseño de ligandos múltiples
DSC	calorimetría diferencial de barrido
EC <sub>50</sub>	concentración efectiva 50
e.e.m	error estándar de la media
EM	espectroscopía de masas
EtOH	etanol
FTIR-ATR	Fourier transform infrared spectroscopy-Attenuated Total
g	gramo
GPCRs	receptores acoplados a proteínas G
GTP	guanosintrifosfato
h	hora
HCl	ácido clorhídrico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ácido sulfúrico
Hz	herzios
ILs	líquidos iónicos
Ki	constante de afinidad
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonato potásico
LiHMDS	hexametildisilazano de litio
Luc	Luciferasa
m	multiplete
M	molar
MeOH	metanol
mg	miligramo
MgSO <sub>4</sub>	sulfato magnésico
mL	mililitro
min	minuto
mmol	milimol

$\mu\text{L}$	microlitro
MHz	megahertzio
MW	microondas
N-CoR	corepresor nuclear
n.d.	no determinado
nM	nanomolar
nm	nanómetro
OEA	oleiletanolamida
PPREs	elementos de respuesta a proliferadores peroximales
P.f.	punto de fusión
ppm	partes por millón
PPAR	receptores activados por proliferadores peroximales
PUFAs	ácidos grasos poliinsaturados
POCS	síndrome de ovario poliquístico
q	quintuplete
RTILs	líquidos iónicos a temperatura ambiente
RXR	ácido 9-cisretinoico
s	singlete
SCE	sistema cannabinoide endógeno
t	triplete
$T_c$	temperatura de cristalización
$T_g$	temperatura de transición vítrea
TGA	estudios de estabilidad térmica
THF	tetrahidrofurano
$\Delta^9\text{THC}$	(-)- $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol
tk	timidina-kinasa
$T_m$	temperature de fusión
$T_{\text{onset}}$	temperatura de descomposición
TRP	receptores de potencial transitorio
TRPA1	receptor de potencial transitorio anquinina
TRPV1	receptor de potencial transitorio vanilloide
TZDs	tiazolidindionas
u.v	ultravioleta
WAXS	difracción de rayos X en ángulo grande

# Introducción y objetivos generales

Esta tesis se ha desarrollado en el Instituto de Química Médica del CSIC siguiendo la línea principal en lo que se refiere al diseño y síntesis de nuevas estructuras químicas como potenciales fármacos.

El desarrollo de fármacos es un proceso complejo en el que participan muchas disciplinas científicas, y que además resulta muy costoso tanto en tiempo, como en recursos económicos. A pesar de que existe en la actualidad un considerable número de fármacos, y de que los medicamentos son responsables tanto de la mejora de la calidad de vida como de que la expectativa de la misma haya crecido sustancialmente en los últimos años, continúa siendo muy necesaria su investigación.

Hay diferentes aproximaciones que se utilizan para el diseño de fármacos. Desde las asociadas a tecnologías modernas, como el cribado molecular de alto rendimiento (HTS, high throughput screening), bioinformática y genómica, hasta otras más tradicionales como la inspiración en productos naturales, el diseño de análogos estructurales o la modificación química de fármacos establecidos.

En concreto, en esta tesis se aborda el diseño de potenciales fármacos con aplicación en dos campos terapéuticos importantes: el denominado síndrome metabólico y analgesia. Se han utilizado diferentes aproximaciones para el diseño, y como dianas terapéuticas se han seleccionado unos receptores nucleares, los activados por proliferadores de peroxisoma (PPARs), unos acoplados a proteína G (cannabinoides), y un canal iónico (TRPA1), involucrados en el síndrome metabólico y el dolor. En lo que al tipo de estructuras químicas se refiere, se han preparado estructuras “de novo” pero también se han utilizado fármacos establecidos para llevar a cabo modificaciones estructurales sobre los mismos.

Así pues los objetivos de esta tesis se desarrollan en los siguientes tres capítulos:

## **Capítulo1. Síntesis y evaluación de nuevos ligandos PPAR y ligandos duales PPAR/CB**

- síntesis de un ligando PPAR de primera generación
- síntesis de ligandos PPAR basados en un modelo reciente de farmacóforo
- estudios de interacción ligando/receptor

- evaluación “in vitro” de la actividad PPAR y estudios de ingesta en animales
- síntesis de ligandos duales PPAR/Cannabinoide
- evaluación de la actividad PPAR y estudios de afinidad por el receptor cannabinoide

## **Capítulo 2. Líquidos iónicos en química médica**

- preparación de líquidos iónicos formados por principios activos
- caracterización espectroscópica (RMN) y calorimétrica (TGA y DSC) de los mismos
- evaluación biológica de un líquido iónico derivado de la metformina

## **Capítulo 3. Nueva aproximación en analgesia basada en el paracetamol**

- desarrollo de una ruta sintética eficaz para la preparación de adamantil derivados de acetaminofen
- evaluación de la actividad analgésica en ratón
- estudio del posible mecanismo de acción.

# Capítulo 1

Una de las aproximaciones mas utilizadas para preparar un nuevo fármaco es identificar una diana terapéutica sobre la que se quiere incidir y utilizando el conocimiento de la estructura tridimensional de la misma diseñar una molécula capaz de interaccionar con ella. Estas dianas están involucradas en procesos fisiológicos o patológicos que se pretende inhibir, potenciar o modular. En términos mas concretos las dianas terapéuticas son entre otras, las enzimas, los receptores, los canales iónicos, los transportadores etc, siendo la mayoría de los fármacos comercializados inhibidores enzimáticos y ligandos de receptores.

Esta idea de una patología, una diana terapéutica sigue estando vigente pero, mas recientemente, se ha visto que hay enfermedades en las que puede ser interesante atacar mas de una diana como por ejemplo las enfermedades del sistema nervioso, el cáncer o la obesidad y, por eso, se esta trabajando en ligandos múltiples, que son moléculas capaces de interaccionar al mismo tiempo con mas de una diana.

En este capítulo se ha elegido el receptor PPAR como diana relevante en una patología concreta, el síndrome metabólico, y se han diseñado nuevos agonistas de este receptor basados en la estructura cristalina de complejos formados por otros ligandos unidos al centro activo del receptor.

Asimismo, se han preparado ligandos duales capaces de unirse simultáneamente a los PPAR y a los receptores cannabinoides CB que forman parte de un complejo sistema de señalización que regula muchos procesos fisiológicos, como por ejemplo el del apetito, de ahí su potencial utilidad para tratar la obesidad, uno de los factores del síndrome metabólico.

La evaluación farmacológica de los nuevos compuestos se ha llevado a cabo tanto “in vitro”, en ensayos de desplazamiento de radioligando, como “in vivo”, en estudios de ingesta de comida en rata. Asimismo se han estudiado, por técnicas computacionales y de “docking” las interacciones de los compuestos activos con los receptores.

## 1.1. INTRODUCCIÓN

### 1.1.1. SÍNDROME METABÓLICO

El síndrome metabólico fue definido por Kylin hacia los años 20 como la asociación entre la hipertensión arterial, la hiperglucemia y la gota.<sup>1</sup> Años después, Reaven lo definió como “Síndrome X” y demostró la existencia de un conjunto de alteraciones metabólicas relacionadas con la resistencia a la insulina.<sup>2</sup>

Como se observa en la Figura 1, el síndrome metabólico es un conjunto de factores de riesgo que incluye la resistencia a la insulina, la dislipemia, la obesidad y la hipertensión.<sup>3</sup> En la actualidad, este conjunto de desórdenes metabólicos se han relacionado de forma directa con el aumento notable a nivel mundial de casos de diabetes tipo 2 y de enfermedades cardiovasculares (CV).

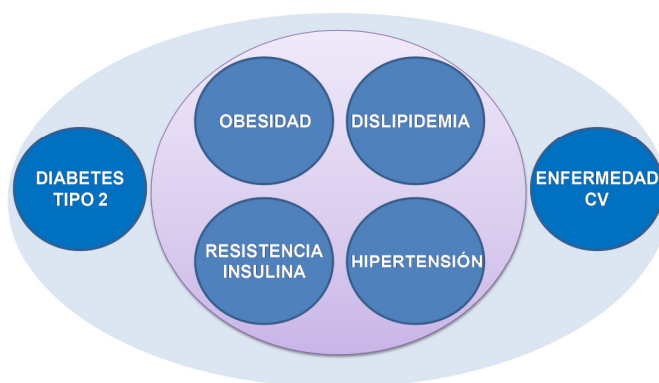


Figura 1. Desórdenes metabólicos asociados al síndrome metabólico.

<sup>1</sup> Reaven, G. M. *Diabetes* **1988**, 37, 1595.

<sup>2</sup> Zimmet, P.; Alberti, K. G. M.; Serrano Ros, M. *Revista Espanola de Cardiologia (Internet)* **2005**, 58, 1371.

<sup>3</sup> Grundy, S. M. *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, 5, 295.

Los diferentes estudios realizados demuestran la estrecha relación entre las diversas alteraciones metabólicas, por ello no es posible abordar esta enfermedad como si respondiera a una única causa. La *obesidad* es uno de los desórdenes crónicos graves de la sociedad industrializada. Esta enfermedad se caracteriza por un exceso de grasa en tejido adiposo y en diferentes órganos implicados en la respuesta a insulina. Se ha demostrado que un aumento en los niveles de lípidos es una de las causas de la aparición de *resistencia a la insulina* asociada a la obesidad. Además, aumenta la gluconeogénesis en hígado lo cual deteriora la secreción de insulina por parte de las células pancreáticas  $\beta$ .<sup>4</sup> La resistencia a dicha hormona de forma continuada puede desencadenar estados pre-diabéticos, e incluso el desarrollo de diabetes tipo 2.

Los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre las principales alteraciones metabólicas involucradas, son alarmantes. Recientemente, la *obesidad* figura entre los cinco principales factores de riesgo de mortalidad y es considerada por la OMS como una epidemia mundial que causa 2.8 millones de muertes al año. En cuanto a la obesidad infantil se estima que más de 42 millones de niños menores de 5 años sufren obesidad. La *dislipemia* e *hipertensión* han sido relacionadas de forma directa con el aumento potencial de enfermedades cardiovasculares.

Dos de las causas principales del síndrome metabólico son la diabetes tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares. Los datos estadísticos presentados por la

---

<sup>4</sup> Goto, T.; Kim, Y.-I.; Funakoshi, K.; Teraminami, A.; Uemura, T.; Hirai, S.; Lee, J.-Y.; Makishima, M.; Nakata, R.; Inoue, H. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* **2011**, 301, E1022.

OMS indican que las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en el mundo y que más de 347 millones de personas sufren diabetes tipo 2. Por todo ello, el síndrome metabólico se ha convertido en uno de los principales problemas para la salud pública del siglo XXI sobre el que se están realizando notables esfuerzos desde la industria y la academia en el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas para tratarlo.<sup>5</sup>

Entre las diferentes dianas terapéuticas implicadas en el síndrome metabólico nos centraremos tanto en los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) como en los receptores cannabinoides.

### **1.1.2. RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS (PPARs).**

Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) fueron clonados en 1990. Se identificaron como miembros huérfanos de la superfamilia de receptores nucleares junto a los receptores de vitamina D, los receptores retinoides y esteroides y los receptores de las hormonas tiroideas. Existen 3 isoformas denominadas PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y PPAR $\beta/\delta$  las cuales se presentan con una alta homología secuencial y estructural.<sup>6</sup> Los PPARs se caracterizan por su capacidad para unirse a secuencias específicas de ADN y su activación da lugar a la regulación de la expresión de un gran número de genes. Se encuentran involucrados en numerosos procesos biológicos como la diferenciación celular,

---

<sup>5</sup> Grundy, S. M. *Nature Reviews Drug Discovery* **2009**, 8, 341.

<sup>6</sup> Shearer, B. G.; Billin, A. N. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2007**, 1771, 1082.



el metabolismo y homeostasis de glucosa, la regulación de lípidos y el metabolismo del colesterol.

#### *Mecanismo de acción*

En la Figura 2 se ilustra de manera esquemática la transcripción de genes mediada por PPAR. El receptor adopta su conformación transcripcionalmente activa al producirse la unión con el ligando, y esto permite la interacción con proteínas que se asocian al extremo carboxílico de los receptores nucleares (co-activadores o co-represores). De esta manera se induce la dimerización con el receptor del ácido 9-*cis*retinoico (RXR) y la unión a secuencias de ADN específicas, las cuales constituyen los elementos de respuesta a proliferadores peroximales (PPRE) presentes en la región promotora de los genes diana. La unión del complejo dará lugar a la activación de la transcripción (homeostasis de lípidos o glúcidos) o inhibición de la transcripción (actividad antiinflamatoria) de genes blanco.

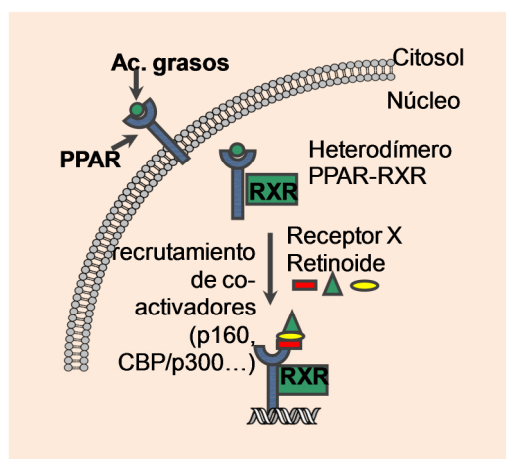


Figura 2. Mecanismo básico de acción de PPAR.

*PPARs como dianas terapéuticas***PPAR $\alpha$** 

PPAR $\alpha$  se expresan principalmente en tejido adiposo y en hígado, y en menor medida se localizan en músculo esquelético, corazón y riñones. Su activación por parte de ligandos endógenos o moléculas lipófilas sintéticas, da lugar al control de genes involucrados en numerosos procesos metabólicos. Intervienen en la reducción de los niveles de triglicéridos de baja densidad (VLDL), en la regulación positiva de los transportadores involucrados en los niveles de colesterol y en el aumento de la absorción y oxidación de ácidos grasos. Existen evidencias experimentales que sugieren que su activación atenúa o inhibe varios mediadores del daño vascular incluyendo lipotoxicidad, inflamación, angiogénesis y trombosis.<sup>7</sup>

**PPAR $\gamma$** 

Estos receptores se encuentran expresados en tejido adiposo, macrófagos y músculo esquelético. Numerosos trabajos en la literatura han demostrado que su activación favorece el aumento de la sensibilidad a insulina en tejido adiposo, músculo esquelético e hígado; además, favorece el consumo de glucosa y ácidos grasos. Recientemente, se ha demostrado que debido a su expresión en diferentes células inmunes (linfocitos B y T, monocitos, macrófagos, células dendríticas y granulocitos) se encuentran involucrados en enfermedades

---

<sup>7</sup> Hiukka, A.; Maranghi, M.; Matikainen, N.; Taskinen, M.-R. *Nature Reviews Endocrinology* **2010**, 6, 454.

relacionadas con procesos antiinflamatorios, bloqueo de ciclos celulares y apoptosis.<sup>8</sup>

### PPAR $\beta/\delta$

Debido a los pocos ligandos selectivos conocidos y a su ubicuidad esta isoforma ha sido la menos estudiada desde la clonación de estos receptores nucleares. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado su implicación en el control de diferentes desórdenes metabólicos. Su activación mejora la oxidación de ácidos grasos en músculo esquelético, la reducción de triglicéridos y los niveles de proteínas de alta densidad (HDL).<sup>9,10</sup> Por otro lado, ha sido destacada su actividad protectora frente al desarrollo de tumores, especialmente del cáncer de colon.

### *Características estructurales de los PPARs*

La organización estructural y funcional de las diferentes isoformas es similar a la del resto de los receptores nucleares. Su estructura se divide en 4 dominios perfectamente identificados, el dominio A/B, C, D y E. El dominio A/B porta el extremo N-terminal y contiene la Función de Activación 1 (AF-1), que es independiente de ligando. El dominio C codifica la región de unión al ADN (DBD) y es el responsable de la unión del receptor a los elementos de respuesta, los

---

<sup>8</sup> Higgins, L. S.; DePaoli, A. M. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2010**, 91, 267S.

<sup>9</sup> Coll, T.; Rodríguez-Calvo, R.; Barroso, E.; Serrano, L.; Eyre, E.; Palomer, X.; Vázquez-Carrera, M. *Curr Mol Pharmacol* **2009**, 2, 46.

<sup>10</sup> Batista, F. A.; Trivella, D. B.; Bernardes, A.; Gratieri, J.; Oliveira, P. S.; Figueira, A. C. M.; Webb, P.; Polikarpov, I. *PLoS One* **2012**, 7, e33643.

cuales se encuentran en la región promotora del gen diana. El dominio D une el DBD con el dominio de unión al ligando (LBD) y es el lugar de acoplamiento de los diferentes cofactores. Por último, el dominio E es el portador del extremo C-terminal y está formado por dos dominios principales para la activación de los receptores LBD y el dominio de activación dependiente de ligando (AF-2). El LBD es el que determina la especificidad del ligando y la modulación de la expresión del gen. Finalmente, el AF-2 está localizado en el extremo C-terminal de la Hélice 12 y determina la unión del ligando y el reclutamiento de los cofactores PPAR.<sup>11</sup>

#### *Ligandos PPAR $\alpha$*

Los PPAR $\alpha$  son activados por compuestos con gran diversidad estructural. Como se observa en la Figura 3, el diseño de los ligandos PPAR $\alpha$  ha evolucionado a lo largo de los años. La identificación de diferentes ácidos grasos saturados e insaturados como ligandos endógenos, ha dado lugar al desarrollo de análogos sintéticos con moderada afinidad por PPAR $\alpha$ . Por ejemplo, la actividad PPAR $\alpha$  agonista de la OEA ha permitido la síntesis de una serie de sulfamoiil derivados de este ácido graso con actividad *in vitro* e *in vivo*.<sup>12</sup> Trabajos recientes han descrito el compuesto denominado farnesol (ligando natural) como

---

<sup>11</sup> Pirat, C. I.; Farce, A.; Lebègue, N.; Renault, N.; Furman, C.; Millet, R. g.; Yous, S. d.; Specq, S.; Berthelot, P.; Desreumaux, P. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 4027.

<sup>12</sup> Cano, C.; Pavón, J.; Serrano, A.; Goya, P.; Paez, J. A.; de Fonseca, F. R.; Macias-Gonzalez, M. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50*, 389.

un ligando agonista PPAR $\alpha$ , este derivado reduce la obesidad como causa de hiperglicemia.<sup>13</sup>

En 1965, se identificaron los primeros fibratos como ligandos agonistas de este receptor y se demostró que el clofibrato y el resto de derivados reducían los niveles de colesterol HDL. Años más tarde se aprobó su uso clínico para el tratamiento de la dislipemia. Los efectos secundarios adversos de este fibrato provocaron su retirada del mercado y el desarrollo de una segunda generación de ligandos agonistas PPAR $\alpha$ , tales como fenofibrato, ciprofibrato, bezafibrato y gemfibrosil. Estos derivados aún presentando una potencia y selectividad moderada, siguen siendo utilizados en clínica para el tratamiento de la dislipemia.

Los numerosos estudios sobre la estructura tridimensional del receptor han permitido el diseño y desarrollo de ligandos más potentes y selectivos.<sup>11</sup> Esta nueva generación presenta una gran diversidad estructural, de compuestos más voluminosos, con el fin de ocupar el gran hueco del receptor. Entre los derivados de fibratos se encuentran el LY518674<sup>14</sup> y GW590735; y derivados de chalconas como DE027 que presenta un potencial efecto hipolipídico. La presencia de la

---

<sup>13</sup> Goto, T.; Takahashi, N.; Kato, S.; Kim, Y.-I.; Kusudo, T.; Taimatsu, A.; Egawa, K.; Kang, M.-S.; Hiramatsu, T.; Sakamoto, T. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 11952.

<sup>14</sup> Xu, Y.; Mayhugh, D.; Saeed, A.; Wang, X.; Thompson, R. C.; Dominianni, S. J.; Kauffman, R. F.; Singh, J.; Bean, J. S.; Bensch, W. R. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 5121.

cabeza polar y el extremo hidrofóbico en los derivados NS-220 y KCL<sup>15</sup> favorece la actividad y selectividad por PPAR $\alpha$  (Figura 3).

En la bibliografía actual existen pocos derivados con actividad antagonista por PPAR $\alpha$ , algunos de ellos presentan elevadas afinidades por el receptor bloqueando la actividad de ligandos agonistas totales.<sup>16</sup>

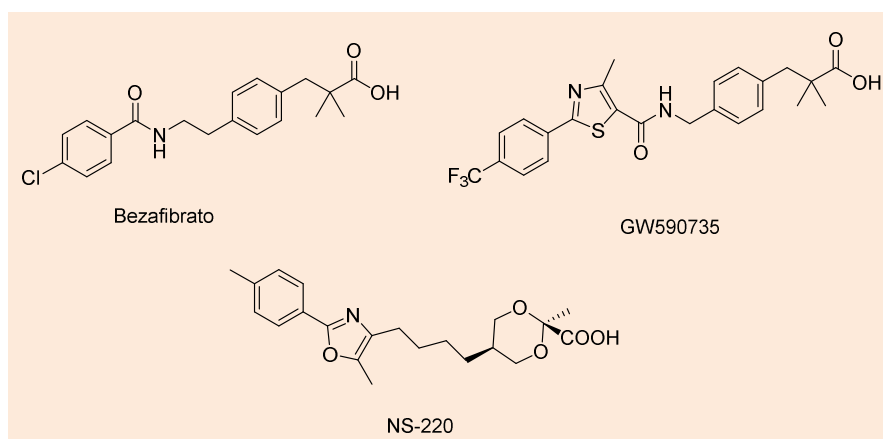


Figura 3. Ligandos PPAR $\alpha$ .

#### Ligandos PPAR $\gamma$

Las tiazolidina-2,4-dionas (TZDs) o glitazonas fueron los primeros ligandos sintéticos con afinidad por PPAR $\gamma$ . Desde hace una década continúan en el mercado como los primeros sensibilizadores de insulina, por su efecto positivo en hiperglucemia e hiperinsulinemia y en la reducción de resistencia a insulina. A

<sup>15</sup> Nomura, M.; Tanase, T.; Ide, T.; Tsunoda, M.; Suzuki, M.; Uchiki, H.; Murakami, K.; Miyachi, H. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, 46, 3581.

<sup>16</sup> Ammazalorso, A.; D'Angelo, A.; Giancristofaro, A.; De Filippis, B.; Di Matteo, M.; Fantacuzzi, M.; Giampietro, L.; Linciano, P.; Maccallini, C.; Amoroso, R. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2012**.

partir de la ciglitazona, el primer derivado descrito,<sup>17</sup> se ha desarrollado una primera generación de este tipo de estructuras moleculares. Estudios de relación estructura y actividad han demostrado la importancia del grupo metileno como espaciador y la presencia necesaria del grupo 4-oxilbencil para la actividad hipoglicémica e hipolipidémica. Además se ha demostrado que el anillo de tiazolidina-2,4-diona es importante en la afinidad por el receptor, así el cambio de este por otros anillos conlleva una baja afinidad o la pérdida total de actividad. La Troglitazona fue retirada del mercado en 1997, por hepatotoxicidad severa; actualmente, la Rosiglitazona y la Pioglitazona son utilizadas en clínica para el tratamiento de la diabetes tipo 2.

Los efectos adversos provocados por este tipo de fármacos como el aumento de peso, retención de líquidos e incluso efectos cardiovasculares han dado lugar a nuevas generaciones de ligandos PPAR $\gamma$ .<sup>18</sup> En la actualidad, se lleva a cabo el diseño y síntesis de ligandos PPAR $\gamma$  agonista parciales, PPAR $\gamma$  moduladores selectivos (SPPARMs) y PPAR $\gamma$  antagonistas (Figura 4). Los ligandos con moderada actividad por PPAR $\gamma$  han mostrado excelentes resultados en la reducción de resistencia a la insulina y de obesidad, minimizando los efectos adversos presentados por los agonistas totales. Estos ligandos inducen diferentes efectos transcripcionales a los presentados por las glitazonas clásicas, como por ejemplo PMT-13 que ha mostrado excelentes resultado *in vitro* e *in*

---

<sup>17</sup> Lohray, B. B.; Bhushan, V.; Rao, B. P.; Madhavan, G. R.; Murali, N.; Rao, K. N.; Reddy, A. K.; Rajesh, B. M.; Reddy, P. G.; Chakrabarti, R. *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41*, 1619.

<sup>18</sup> Picard, F.; Auwerx, J. *Annual Review of Nutrition* **2002**, *22*, 167.

*vivo*.<sup>19</sup> Otros ligandos PPAR $\gamma$  agonista parciales como PAT5A y PAR-1622 presentan resultados *in vivo* comparables a los de las glitazonas de referencia y reducen efectos adversos como el aumento de peso y la retención de líquidos.<sup>20,21</sup> Recientes estudios biológicos y cristalográficos han demostrado que compuestos como KR-62276 y KR-62980 se unen de forma diferente al LBD del receptor, lo cual podría justificar el agonismo parcial característico de estos ligandos (Figura 4).

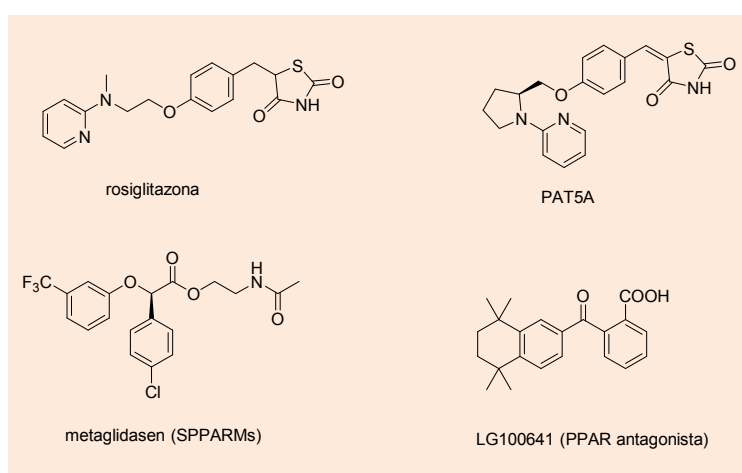


Figura 4. Ligandos PPAR $\gamma$ .

#### *Ligandos PPAR $\beta/\delta$*

El desarrollo de estos ligandos ha estado limitado por la ubicuidad de esta isoforma si bien en la actualidad, se han identificado una gran variedad de

<sup>19</sup> Madhavan, G. R.; Chakrabarti, R.; Vikramadithyan, R. K.; Mamidi, R. N.; Balraju, V.; Rajesh, B.; Misra, P.; Kumar, S. K.; Lohray, B. B.; Lohray, V. B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2002**, 10, 2671.

<sup>20</sup> Misra, P.; Chakrabarti, R.; Vikramadithyan, R. K.; Bolusu, G.; Juluri, S.; Hiriyani, J.; Gershon, C.; Rajak, A.; Kashireddy, P.; Yu, S. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2003**, 306, 763.

<sup>21</sup> Kim, M.-K.; Chae, Y. N.; Kim, H. S.; Choi, S.-h.; Son, M. H.; Kim, S. H.; Kim, J. K.; Moon, H. S.; Park, S. K.; Shin, Y. A. *Archives of Pharmacal Research* **2009**, 32, 721.



compuestos de naturaleza agonista. Algunos ejemplos son el L-165041, *PPAR $\beta/\delta$*  agonista selectivo, el cual ha presentado resultados moderados *in vitro* y propiedades neuroprotectoras en diferentes modelos animales.<sup>22</sup> Los compuestos GW501516 y GW0742, propiedad de GlaxoSmithKline, aumentan los niveles de colesterol-HDL y disminuyen la concentración de colesterol-LDL y triglicéridos.<sup>23</sup> Los derivados LC1765 y I regulan la expresión de genes involucrados en la homeostasis de energía con excelentes propiedades farmacocinéticas.<sup>24</sup> El compuesto KD3010, desarrollado por Kalypsys Inc., muestra propiedades antihiperlipémicas, aumento de la sensibilidad a insulina y reducción de lípidos en modelo animal. Recientemente, al igual que ocurre con los otras isoformas, se están desarrollando nuevos derivados con actividad parcial y antagonista por el *PPAR $\beta/\delta$*  (Figura 5).

---

<sup>22</sup> Iwashita, A.; Muramatsu, Y.; Yamazaki, T.; Muramoto, M.; Kita, Y.; Yamazaki, S.; Mihara, K.; Moriguchi, A.; Matsuoka, N. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2007**, *320*, 1087.

<sup>23</sup> Barroso, E.; Eyre, E.; Palomer, X.; Vázquez-Carrera, M. *Biochemical Pharmacology* **2011**, *81*, 534.

<sup>24</sup> Epple, R.; Cow, C.; Xie, Y.; Azimioara, M.; Russo, R.; Wang, X.; Wityak, J.; Karanewsky, D. S.; Tuntland, T.; Nguyễn-Trần, V. n. T. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *53*, 77.

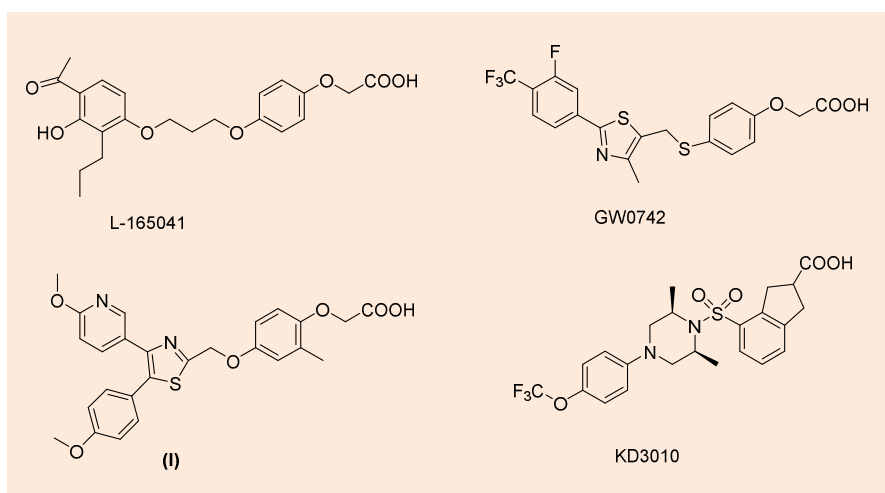


Figura 5. Ligandos PPAR $\beta/\delta$ .

*Ligandos PPAR $\alpha$ / $\gamma$ , PPAR $\gamma$ / $\delta$  y pan- PPAR $\alpha$ / $\gamma$ / $\delta$*

La posibilidad de obtener un efecto sinérgico por la activación de varias isoformas ha dado lugar al desarrollo de ligandos de naturaleza co-agonista. Dicha actividad dual podría reducir los efectos adversos inducidos por las diferentes entidades estructurales administradas de forma individual. Este hecho les convierte en interesantes compuestos para el tratamiento de enfermedades de carácter multifactorial.<sup>25</sup> En la actualidad, tanto la investigación académica como la industria farmacéutica trabajan en el desarrollo de compuestos con actividad PPAR $\alpha$ / $\gamma$  agonistas, PPAR $\gamma$ / $\delta$  agonistas, PPAR $\gamma$ / $\delta$  agonistas y los denominados pan-PPAR  $\alpha$ / $\gamma$ / $\delta$ . Diferentes derivados del ácido  $\alpha$ -alcoxi/ariloxi- $\beta$ -fenilpropiónico presentan actividad PPAR $\alpha$ / $\gamma$  agonista siendo el Tesaglitazar de AstraZeneca el primer ligando de esta familia descrito en 2001. Sus diferentes

<sup>25</sup> Jones, D. *Nature Reviews Drug Discovery* **2010**, 9, 668.

efectos adversos llevaron a paralizar sus ensayos clínicos en 2006, al igual que sucedió con Ragaglitazar y Naveglitazar, pertenecientes a la misma familia de derivados. En la actualidad, tan solo el Aeglitzar se encuentra en fase clínica con buenos resultados en la reducción de complicaciones macrovasculares desarrolladas por la diabetes tipo 2. Por otro lado, la activación PPAR $\gamma/\delta$  permitiría el control de los niveles de lipoproteínas en sangre y la reducción de adiposidad. Dicha combinación corregiría los diferentes desórdenes metabólicos causados por la diabetes tipo 2. Una gran variedad de derivados de fibrato como los compuestos **II**, **III** y **IV** han sido publicados en la literatura como potentes ligandos PPAR $\alpha/\gamma$  agonistas.<sup>26,27</sup>

La activación combinada de PPAR $\gamma$  y PPAR $\beta$  ha suscitado gran interés como tratamiento para los diferentes desórdenes metabólicos asociados a la diabetes tipo 2, así han mostrado una potente actividad como PPAR $\gamma/\delta$  agonistas. Recientemente se han publicado derivados selectivos PPAR $\gamma/\delta$  agonistas los cuales no muestran los efectos secundarios asociados a los ligandos PPAR $\gamma$  agonistas puros.<sup>28</sup> Junto a los agonistas duales PPAR se estudia la combinación

---

<sup>26</sup> Liu, K.; Xu, L.; Berger, J. P.; MacNaul, K. L.; Zhou, G.; Doebber, T. W.; Forrest, M. J.; Moller, D. E.; Jones, A. B. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 2262.

<sup>27</sup> Koyama, H.; Miller, D. J.; Boueres, J. K.; Desai, R. C.; Jones, A. B.; Berger, J. P.; MacNaul, K. L.; Kelly, L. J.; Doebber, T. W.; Wu, M. S. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 3255.

<sup>28</sup> Gathiaka, S.; Nanayakkara, G.; Boncher, T.; Acevedo, O.; Wyble, J.; Patel, S.; Patel, A.; Shane, M. E.; Bonkowski, B.; Wiczorek, J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**.

de las tres actividades en una única molécula, derivados como **V** han impulsando el interés por su farmacología (Figura 6).<sup>29,30</sup>

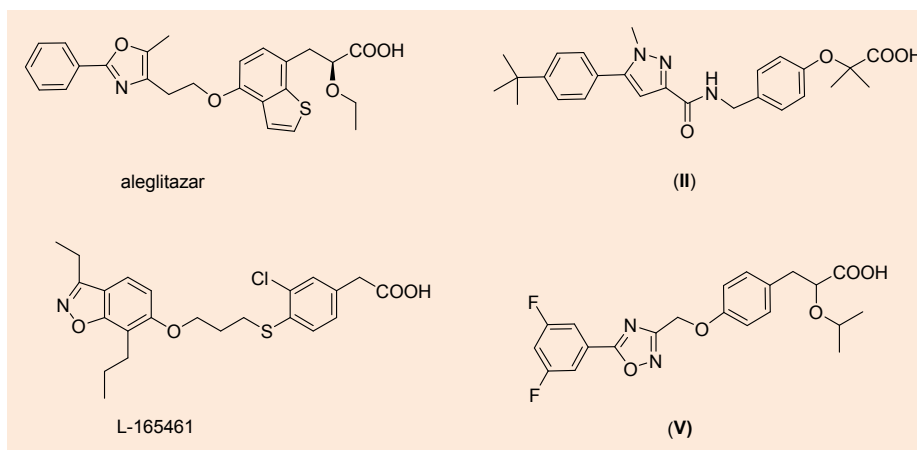


Figura 6. *Ligandos PPAR $\alpha/\gamma$ , PPAR $\gamma/\delta$  y pan- PPAR $\alpha/\gamma/\delta$*

### 1.1.3. RECEPTORES CANNABINOIDES

Si bien los efectos psicotrópicos y terapéuticos de la planta *Cannabis sativa* son conocidos desde hace siglos, no fue hasta los años 60 que tuvo lugar el aislamiento y caracterización de sus componentes activos, y hubo que esperar tres décadas más para entender que estos efectos eran debidos a su interacción con los receptores cannabinoides.

Estos receptores denominados CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> junto con los ligandos endógenos y sus correspondientes procesos de síntesis y degradación, constituyen el denominado sistema endocannabinoide endógeno (SCE) (Figura 7).<sup>31</sup>

<sup>29</sup> Feldman, P.; Lambert, M.; Henke, B. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2008**, 8, 728.

<sup>30</sup> Artis, D. R.; Lin, J. J.; Zhang, C.; Wang, W.; Mehra, U.; Perreault, M.; Erbe, D.; Krupka, H. I.; England, B. P.; Arnold, J. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, 106, 262.

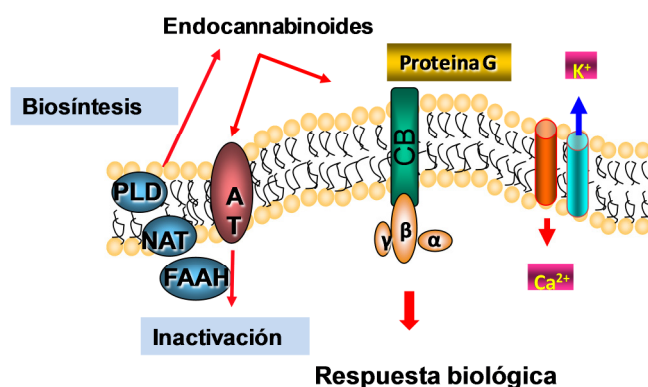


Figura 7. Sistema endocannabinoide endógeno (SCE).

Este es un complejo sistema de señalización que está implicado en numerosos procesos fisiológicos y patológicos como el apetito, el dolor y el cáncer entre otros, y por tanto, el diseño y síntesis de nuevos ligandos capaces de activar (agonistas) o bloquear (antagonistas) dichos receptores es una línea de investigación en química médica con potencial aplicación en diferentes campos terapéuticos.<sup>32, 33,34,</sup>

En 1990 fue identificado el primer receptor cannabinoide y se denominó receptor CB1;<sup>35</sup> tres años después se clonó el receptor cannabinoide CB2.<sup>36</sup> CB1 y CB2 son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCR). Estos receptores interactúan con el nucleótido guanosintrifosfato (GTP) y actúan como transductores de la señal extracelular al interior de la

<sup>31</sup> Mechoulam, R.; Parker, L. A. *Annual Review of Psychology* **2013**, 64, 21.

<sup>32</sup> Di Marzo, V. *Nature Reviews Drug Discovery* **2008**, 7, 438.

<sup>33</sup> Pertwee, R. G. *British Journal of Pharmacology* **2009**, 156, 397.

<sup>34</sup> Miller, L. K.; Devi, L. A. *Pharmacological Reviews* **2011**, 63, 461.

<sup>35</sup> Matsuda, L. A.; Lolait, S. J.; Brownstein, M. J.; Young, A. C.; Bonner, T. I. *Nature* **1990**, 346, 561.

<sup>36</sup> Munro, S.; Thomas, K. L.; Abu-Shaar, M. **1993**.

célula a través de la membrana celular activando las proteínas G.<sup>37</sup> Su descubrimiento permitió posteriormente la identificación de la anandamida (AEA) y el 2-araquidonoil glicerol (2-AG) como ligandos endógenos. Los endocannabinoides son mediadores lipídicos aislados del cerebro y tejidos periféricos que incluyen amidas, ésteres y éteres de ácidos grasos poliinsaturados. Estos derivados mimetizan la acción del  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) en diferentes procesos biológicos.

### *Receptor CB1*

En un principio el receptor CB1 fue localizado principalmente en el sistema nervioso central, pero estudios posteriores han demostrado su expresión en diferentes células y tejidos no-neuronales. Desde su identificación se ha puesto de manifiesto que este receptor se encuentra involucrado en numerosos procesos biológicos. Se expresa en áreas centrales implicadas en el control del movimiento motor, de la memoria, del aprendizaje y de las emociones. Por otro lado, su presencia en adipocitos, hepatocitos y músculo esquelético mejora las alteraciones lipídicas asociadas a la obesidad, la regulación de glucosa y la oxidación de ácidos grasos.<sup>38,39,40</sup> Recientes estudios farmacológicos han

---

<sup>37</sup> Howlett, A. In *Cannabinoids*; Springer: 2005, p 53.

<sup>38</sup> Sink, K. S.; McLaughlin, P. J.; Wood, J. A. T.; Brown, C.; Fan, P.; Vemuri, V. K.; Pang, Y.; Olzewska, T.; Thakur, G. A.; Makriyannis, A. *Neuropsychopharmacology* **2007**, *33*, 946.

<sup>39</sup> Alen, F.; Crespo, I.; Ramírez-López, M. T.; Jagerovic, N.; Goya, P.; de Fonseca, F. R.; de Heras, R. G.; Orio, L. *PLoS One* **2013**, *8*, e60918.

<sup>40</sup> Bellocchio, L.; Soria-Gómez, E.; Quarta, C.; Metna-Laurent, M.; Cardinal, P.; Binder, E.; Cannich, A.; Delamarre, A.; Häring, M.; Martín-Fontecha, M. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*, 4786.

demostrado que el bloqueo de este receptor mejora enfermedades neurodegenerativas y la adicción al alcohol y nicotina.<sup>41</sup>

### *Receptor CB2*

Inicialmente fue considerado el receptor cannabinoide periférico expresándose principalmente en células inmunes y periféricas.<sup>42</sup> En menor medida se localiza en diferentes tipos celulares como las células del endotelio pulmonar y del sistema gastrointestinal. Se ha demostrado la presencia de estos receptores en el sistema nervioso central,<sup>43</sup> comprobándose por ejemplo su expresión en la microglia cerebral durante los procesos de neuroinflamación.

Su presencia en microglia y en neuronas involucra a este receptor en el control de la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de las mismas. Se ha demostrado que su activación afecta a numerosas respuestas inmunológicas desde la inflamación a la neuroprotección.<sup>44,45</sup> También, se ha demostrado su capacidad analgésica suprimiendo el dolor agudo en diferentes modelos animales.<sup>46</sup>

---

<sup>41</sup> Maldonado, R.; Robledo, P.; Berrendero, F. *Current Opinion in Neurobiology* **2013**.

<sup>42</sup> Klein, T. W.; Lane, B.; Newton, C. A.; Friedman, H. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **2000**, 225, 1.

<sup>43</sup> Onaivi, E. S.; Ishiguro, H.; GONG, J. P.; Patel, S.; Perchuk, A.; Meozzi, P. A.; Myers, L.; Mora, Z.; Tagliaferro, P.; Gardner, E. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2006**, 1074, 514.

<sup>44</sup> Guindon, J.; Hohmann, A. *British Journal of Pharmacology* **2008**, 153, 319.

<sup>45</sup> Horváth, B.; Magid, L.; Mukhopadhyay, P.; Bátka, S.; Rajesh, M.; Park, O.; Tanchian, G.; Gao, R. Y.; Goodfellow, C. E.; Glass, M. *British Journal of Pharmacology* **2012**, 165, 2462.

<sup>46</sup> Atwood, B. K.; Mackie, K. *British Journal of Pharmacology* **2010**, 160, 467.

*Otros receptores cannabinoides*

En la actualidad, existen un gran número de trabajos donde se sugiere la existencia de nuevos receptores cannabinoides.

*GPR55* fue aislado en 1990 como un GPCR huérfano con altos niveles de expresión en estriado humano. Diferentes estudios genéticos han demostrado que no existe apenas analogía entre *GPR55* y *CB1* o *CB2* es insignificante. Hasta el momento, la farmacología de los diferentes ligandos de este receptor es complicada e inconsistente. La AEA y el 2-AG han mostrado afinidad por este receptor, pero los resultados no son reproducibles y por lo tanto no son definitivos. Actualmente, *GPR55* no puede ser considerado como un nuevo receptor cannabinoide.<sup>47</sup>

*GPR35* fue identificado en 1998 como GPCR huérfano. La falta de ligandos específicos ha limitado bastante el conocimiento sobre este receptor. A lo largo de los años la identificación de varios ligandos endógenos y el desarrollo de pequeñas quimiotecas ha facilitado su desarrollo científico. La relación entre este receptor y diferentes patologías como inflamación, asma, hipertensión y diabetes ha sido descrita en trabajos publicados recientemente.<sup>48</sup>

*Ligandos de los receptores cannabinoides*

El conjunto de los ligandos cannabinoides incluye los derivados naturales aislados de la planta, los endocannabinoides y toda aquella entidad química

---

<sup>47</sup> Elbegdorj, O.; Westkaemper, R. B.; Zhang, Y. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2012**.

<sup>48</sup> MacKenzie, A.; Lappin, J.; Taylor, D.; Nicklin, S.; Milligan, G. *Frontiers in Endocrinology* **2011**, 2.



capaz de interactuar con alguno de los componentes pertenecientes al sistema endocannabinoide. A lo largo de los años se han propuesto diferentes clasificaciones de este tipo de ligandos, por ejemplo basándose en la estructura química. Una de las clasificaciones más actuales se refiere a la actividad del ligando: CB1/CB2 agonista, CB1 o CB2 agonista selectivo, CB1 o CB2 antagonista selectivo.<sup>49</sup>

#### *Ligandos CB1 y CB2 agonistas*

Determinados ligandos presentan afinidades similares por ambos receptores, CB1 y CB2. Estos compuestos han sido clasificados en cuatro grupos según su estructura química: clásicos, no clásicos, aminoalquilindoles e eicosanoides. Los compuestos HU-210 y  $\Delta^9$ -THC son derivados dibenzopiranos y pertenecen al grupo de los cannabinoides clásico. El HU-210 muestra una elevada afinidad por ambos receptores y relativa actividad intrínseca como agonista cannabinoide. La afinidad del  $\Delta^9$ -THC, el principal componente psicoactivo del cannabis, es algo menor a la presentada por HU-210 y su actividad es parcialmente agonista. También, los derivados sintéticos como CP55940 y *R*-(+)-WIN55212 presentan afinidad y actividad agonista por ambos receptores. CP55940 fue desarrollado por Pfizer, pertenece al grupo de los ligandos no clásicos y es un análogo bicíclico del  $\Delta^9$ -THC. El derivado titrado de CP55940 fue el primer radioligando

---

<sup>49</sup> Pertwee, R.; Howlett, A.; Abood, M. E.; Alexander, S.; Di Marzo, V.; Elphick, M.; Greasley, P.; Hansen, H. S.; Kunos, G.; Mackie, K. *Pharmacological Reviews* **2010**, 62, 588.

diseñado para realizar los ensayos farmacológicos. *R*-(+)-WIN55212 es el principal derivado aminoalquilindol con elevada potencia CB1/CB2 (Figura 8).

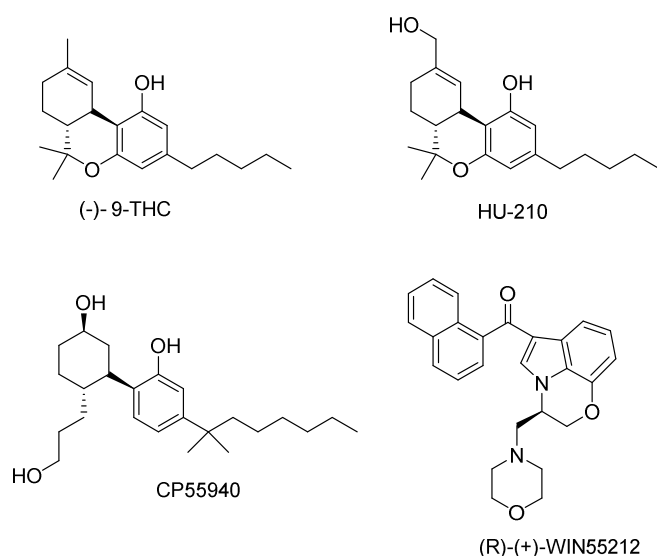


Figura 8. Ligandos CB1 y CB2 agonistas.

#### *Ligandos CB1 y CB2 agonistas selectivos*

Algunos análogos sintéticos de la anandamida (AEA) como la araquidonil-2'-cloroetilamida (ACEA) y la araquidonilciclopropilamida (ACPA) muestran una potente afinidad por CB1 y actividad agonista por dicho receptor. Pertenecen a la familia de ligandos eicosanoides y son el resultado de diferentes modificaciones estructurales. Otro ejemplo de ligando agonista CB1 selectivo es el 2-araquidonil glicerol éter (Noladin éter) aunque este derivado presenta una afinidad inferior a la mostrada por CP55940. Por otro lado, algunos de los ligandos CB2 agonistas selectivos utilizados en farmacología son: JWH-133 y JWH-015 (Figura 9).

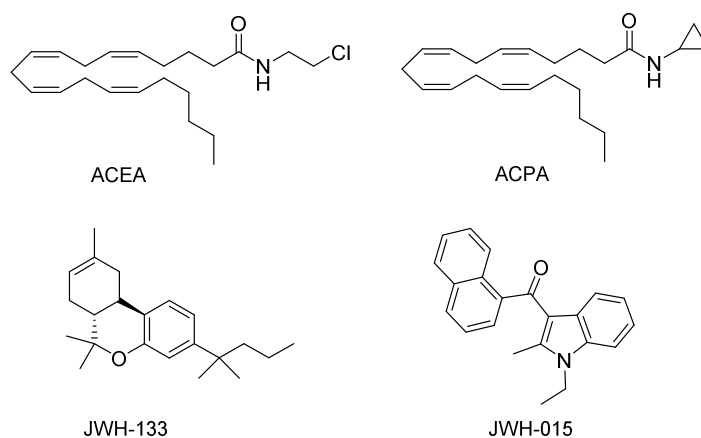


Figura 9. Ligandos CB1 y CB2 agonistas selectivos.

#### *Ligandos CB1 y CB2 antagonistas selectivos*

Los derivados SR141716, AM251, AM281 y LY320135 muestran una elevada afinidad por CB1 y la capacidad de bloquear su actividad agonista. SR141716 denominado rimonabant fue descrito en 1998 por la empresa Sanofi-Aventis. Ante la actividad antagonista de estos derivados, los ensayos realizados en tejido donde se expresa CB1 muestran un efecto cannabimimético inverso, por ello son considerados agonistas inversos. El derivado NESS 0327 es considerado un antagonista neutro porque se comporta como antagonista CB1 pero no muestra resultados relevantes en ensayos de [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S.

Derivados como AM630 y SR144528 muestran una alta afinidad por CB2 y potente capacidad para bloquear la actividad agonista del receptor de manera competitiva. SR144528 es un cannabinoide heterocíclico perteneciente a la familia de los diarilpirazoles, y es considerado el primer ligando CB2 antagonista

con una elevada potencia.<sup>50</sup> Diferentes estudios realizados en tejido han mostrado el efecto cannabimimético inverso de estos derivados, y por ello son considerados agonistas inversos (Figura 10).

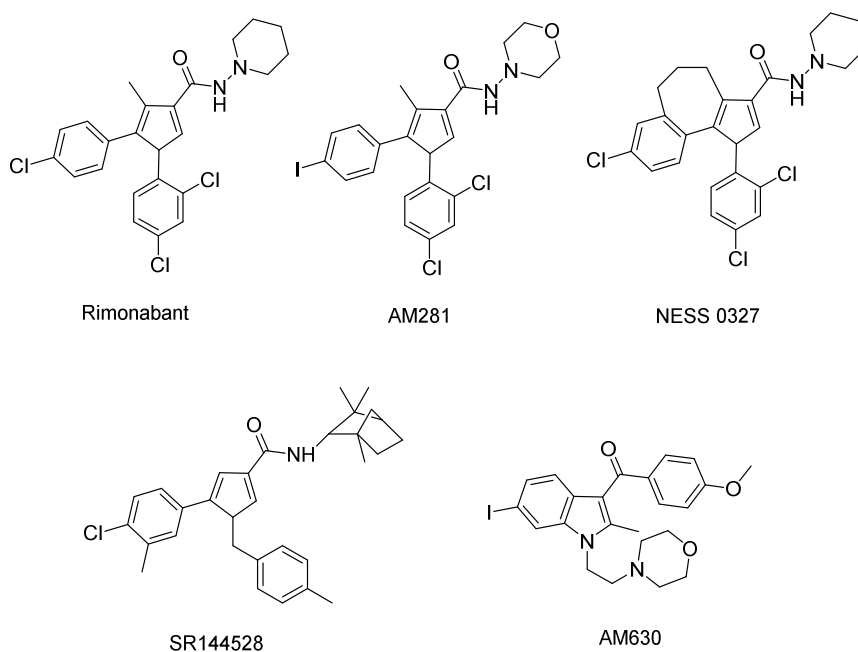


Figura 10. Ligandos CB1 y CB2 antagonistas selectivos.

#### 1.1.4. NUEVA PERSPECTIVA TERAPÉUTICA: DUALIDAD PPAR/CB.

Una vez realizada esta introducción sobre los receptores PPAR y CB y sus correspondientes ligandos, vamos a explicar brevemente el interés de combinar ambas actividades.

Una manera tradicional de preparar un nuevo medicamento es identificar una proteína, enzima o receptor involucrados en un determinado proceso fisiológico y

<sup>50</sup> Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Millan, J.; Derocq, J.-M.; Casellas, P.; Congy, C.; Oustric, D.; Sarrau, M.; Bouaboula, M.; Calandra, B. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1998**, 284, 644.

diseñar un ligando capaz de interaccionar con ellos bloqueando o potenciando dicho proceso. Esta aproximación un tanto reduccionista de “una patología, una diana terapéutica” sigue estando vigente pero se ha comprobado que hay enfermedades con orígenes multifactoriales, como el síndrome metabólico, que pueden responder mejor a la polifarmacología. Así pues, se han desarrollado diferentes estrategias para conseguir terapias multidiana.

La primera estrategia, la más convencional, es el denominado cóctel de fármacos la cual es ampliamente utilizada como terapia antirretroviral para el VIH y en terapias contra el cáncer. El riesgo de interacciones farmacológicas es el inconveniente principal de esta metodología. El desarrollo de la combinación de diferentes fármacos como única formulación ha sido la segunda estrategia llevada a cabo. Las diferentes propiedades farmacocinética, metabólicas y de biodisponibilidad hacen que la combinación de principios activos no sea un problema trivial. La última estrategia es el diseño de una entidad molecular con polifarmacología selectiva. Estos últimos compuestos presentarían una ventaja a la hora de su registro como medicamento. La aprobación de un único compuesto que actúa en diferentes dianas terapéuticas tendría menos barreras reglamentarias que la aprobación de la combinación nuevos fármacos.<sup>51</sup>

El diseño de ligandos múltiples (DML) se basa en tres estrategias diferentes: aneión, unión y fusión.<sup>52</sup> Una de las principales ventajas es su perfil farmacocinético y farmacodinámico propio, independiente de los compuestos por separado. Finalmente, la disminución de las interacciones farmacológicas mejora

---

<sup>51</sup> Hopkins, A. L. *Nature Chemical Biology* **2008**, 4, 682.

<sup>52</sup> Morphy, R.; Rankovic, Z. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48, 6523.

la eficacia y aumenta el perfil de seguridad de este tipo de moléculas (ligandos) duales. En la literatura han sido publicados diferentes compuestos con actividad dual.<sup>53</sup>

La relación entre los receptores CB y PPAR fue confirmada en 2002 tras observar que el 2-AG endógeno aumentaba la actividad transcripcional del PPAR $\alpha$ . Existen trabajos en la bibliografía que demuestran la estrecha relación entre ambos receptores.<sup>54</sup> Los principales endocannabinoides, como la anandamida, y el ácido ajulémico, un análogo estructural del fitocannabinoide  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC), presentan propiedades anti-inflamatorias mediadas por PPAR $\gamma$ . También, ligandos cannabinoides sintéticos como HU210, WIN55212-2 y CP55940 activan al PPAR $\gamma$ . Se ha demostrado que el efecto en la reducción del apetito y pérdida de peso por parte de las aciletanolaminas endógenas como la oleoiletanolamida (OEA) y palmitoiletanolamida (PEA), está mediado por PPAR $\alpha$ . Otros endocannabinoides que activan PPAR $\alpha$  son la anandamida y la virodamina.<sup>55</sup> A raíz de estos resultados biológicos se ha llevado a cabo la co-administración de diferentes moléculas de naturaleza cannabinoide con agonistas de PPAR $\alpha$ . Como ejemplos de co-administración se encuentra la combinación de la OEA (agonista PPAR $\alpha$ ) con Rimonabant (CB1 antagonista) produciendo un mayor efecto en la reducción del apetito y pérdida

---

<sup>53</sup> Costantino, L.; Barlocco, D. *Current Medicinal Chemistry* **2012**, *19*, 3353.

<sup>54</sup> O'sullivan, S. *British Journal of Pharmacology* **2007**, *152*, 576.

<sup>55</sup> O'Sullivan, S.; Kendall, D. *Immunobiology* **2010**, *215*, 611.

de peso<sup>56</sup> o la combinación de anandamida (CB1) y GW7647 (PPAR $\alpha$  agonista) dando lugar a un efecto sinérgico en la disminución del dolor.<sup>57</sup> Como una alternativa a la co-administración es el diseño y síntesis de ligandos duales PPAR/CB.

---

<sup>56</sup> Serrano, A.; del Arco, I.; Javier Pavón, F.; Macías, M.; Perez-Valero, V.; Rodríguez de Fonseca, F. *Neuropharmacology* **2008**, *54*, 226.

<sup>57</sup> Russo, R.; LoVerme, J.; La Rana, G.; D'Agostino, G.; Sasso, O.; Calignano, A.; Piomelli, D. *European Journal of Pharmacology* **2007**, *566*, 117.

## 1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 1.2.1. DISEÑO DE LIGANDOS PPAR $\alpha$ y PPAR $\alpha/\gamma$

#### 1.2.1.1. Introducción y antecedentes

En este capítulo se expone la síntesis de dos series de compuestos derivados de la tercera generación de ligandos PPAR y de un compuesto derivado de la primera generación de ligandos PPAR (Figura 11).

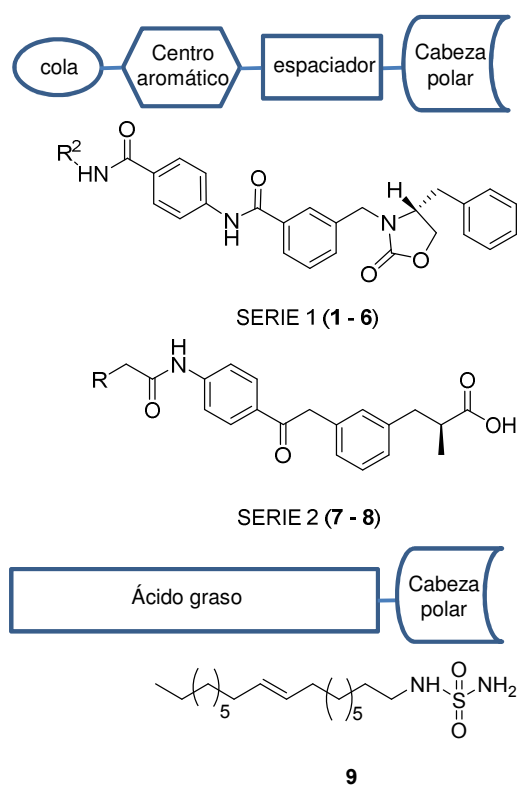


Figura 11. Esquema general de los ligandos PPAR.

El diseño de los ligandos de la tercera generación se ha desarrollado gracias a los numerosos estudios cristalográficos publicados que han permitido determinar



el dominio de unión del ligando (LBD) a través de su estructura tridimensional y proponer el farmacóforo recogido en la Figura 11.<sup>58</sup> Uno de los bloques lo constituyen grupos lipófilos encargados de ocupar gran parte del hueco del receptor; otro bloque a modo de conector; y finalmente, una cabeza polar que permite establecer interacciones con los residuos importantes del LBD, estabilizando de esta forma la Hélice 12.

Otro aspecto importante que se ha tenido en cuenta en el diseño de ambas series ha sido la existencia de centros quirales. En la bibliografía existen numerosos trabajos donde se ha demostrado que la afinidad y la actividad transcripcional de PPARs también dependen de la estereoquímica. Por ejemplo, en el de caso la rosiglitazona (PPAR $\gamma$  agonista selectivo) se ha observado que la (*S*)-rosiglitazona presenta mayor afinidad por PPAR $\gamma$  que la (*R*)-rosiglitazona.

Basándonos en el modelo general anteriormente descrito se han diseñado dos series de compuestos, serie 1 y serie 2. En ambos casos se ha seguido un modelo de síntesis convergente que tiene en común la *N*-aciloxazolidinona como producto de partida. La principal diferencia entre las dos series se encuentra en el extremo polar de las moléculas y en la parte más lipofílica (Figura 12)

---

<sup>58</sup> Pirat, C. I.; Farce, A.; Lebègue, N.; Renault, N.; Furman, C.; Millet, R. g.; Yous, S. d.; Specq, S.; Berthelot, P.; Desreumaux, P. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 4027.

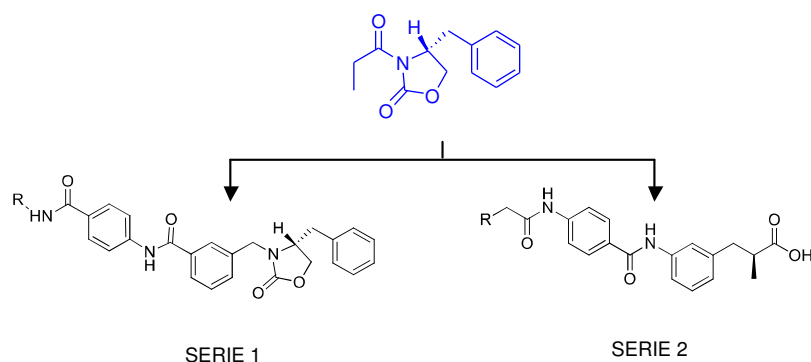
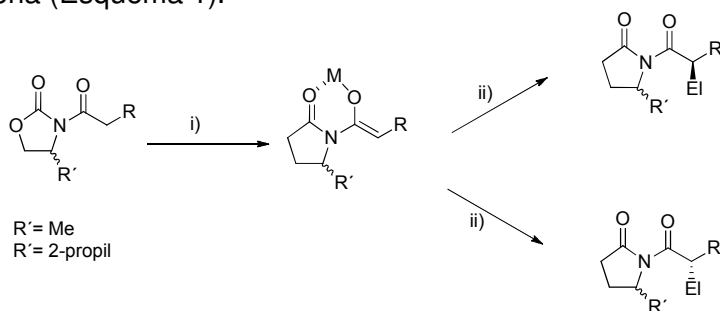


Figura 12. Serie 1 y 2: derivados de *N*-acil oxazolidinona.

El uso de auxiliares quirales es un método habitual en síntesis orgánica para la obtención de ácidos quirales en posición  $\alpha$ . Evans *et al.* y Masamune *et al.* describieron la utilidad de los enolatos derivados de las *N*-aciloxazolidinonas en reacciones de alquilación diastereoselectivas.<sup>59</sup>

Existen dos aspectos clave en este tipo de síntesis asimétrica: el efecto estérico y el uso de amidas de Na o Li para favorecer la enolización estereoselectiva obteniéndose los (*Z*) enolatos correspondientes. La selección diastereofacial viene determinada por la naturaleza del sustituyente en posición 4 del anillo de oxazolidinona (Esquema 1).



Reactivos y condiciones: i)  $\text{MNR}_2$ . ii) y iii)  $\text{EI}^+$ .

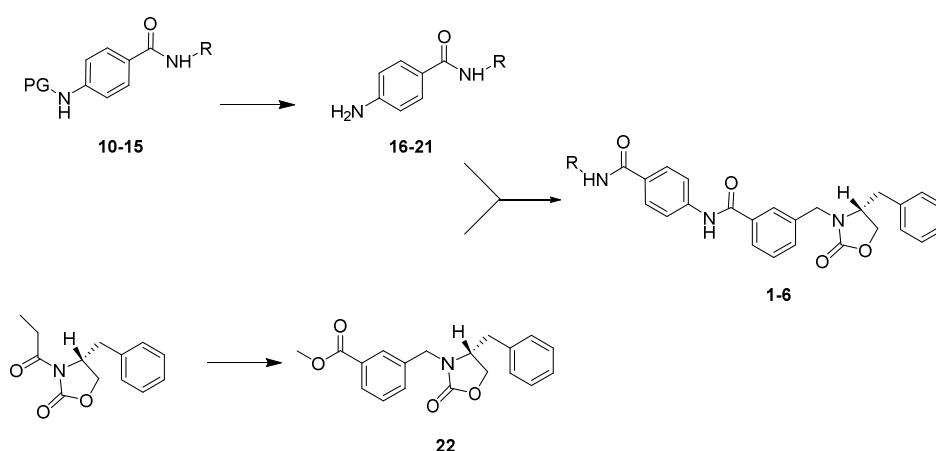
Esquema 1. Síntesis asimétrica de Evans.

<sup>59</sup> Evans, D.; Ennis, M.; Mathre, D. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, 104, 1737.

### 1.2.1.2. Síntesis.

#### 1.2.1.2.1. Síntesis de la serie 1

Como se observa en el Esquema 2 los compuestos finales se obtienen a partir de una reacción de formación de enlace amida entre la oxazolidinona **22** y las aminas previamente sintetizadas.

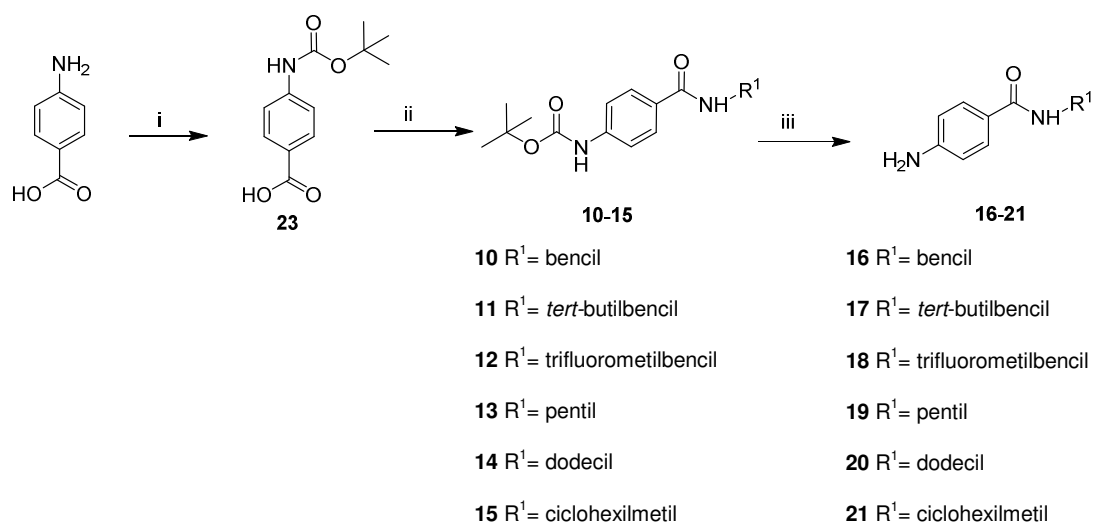


Esquema 2. Esquema de síntesis de los compuestos de la serie 1 (**1-6**).

#### *Síntesis de compuestos 16-21*

Los derivados de benzamida se obtuvieron siguiendo el Esquema 3 de síntesis. Primeramente se protege el grupo amino con anhídrido de Boc, obteniéndose el compuesto **23** con buenos rendimientos. En la siguiente etapa el ácido activado con benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio hexafluorofosfato (PyBOP) en el caso de las aminas aromáticas, y el 1-etil-3-(3-dimetilamonio)propilcarbodiimida (EDCI) para el resto de las aminas alquílicas, se hizo reaccionar con las aminas

correspondientes, obteniéndose los derivados **10-15**. La adición de hidroxibenzotriazol (HOBt) resultó imprescindible para la evolución de la reacción. Finalmente, se llevó a cabo la eliminación del grupo Boc en medio ácido. Tras tres etapas de síntesis, se obtuvieron los derivados **16-21** con rendimientos moderados (Esquema 3).

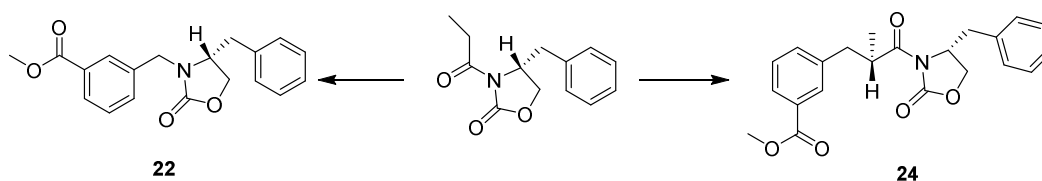


Reactivos y condiciones: (i) Boc<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, dioxano/ H<sub>2</sub>O (2:1), ta, 24 h; (ii) agente de acoplamiento, HOBt, Et<sub>3</sub>N, R<sup>1</sup>NH<sub>2</sub>, disolvente, t.a., 12 h; (iii) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ TFA (1:1), t.a., 12 h.

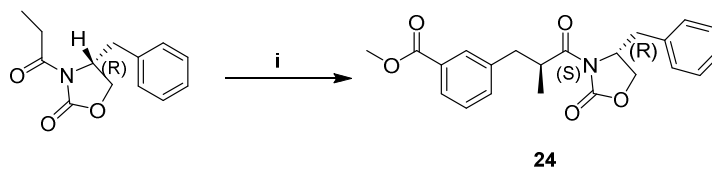
Esquema 3. Síntesis de derivados **16-21**.

#### *Síntesis de derivados de oxazolidinonas **22** y **24***

Los derivados **22** y **24** se obtuvieron a partir de la *N*-aciloxazolidinona en diferentes condiciones de reacción, modificándose la temperatura y la naturaleza de la base (Figura 13).

Figura 13. Derivados de *N*-aciloxazolidinona.*Síntesis del compuesto 24 y determinación de la estereoquímica*

Siguiendo lo descrito por Evans *et al.*<sup>60</sup> las primeras condiciones experimentales ensayadas fueron el uso de hexametildisilazidas de Na (NaHMDS) y Li (LiHMDS) a temperaturas de -78 °C y -20 °C, respectivamente (Esquema 4). Los rendimientos obtenidos en los experimentos con NaHMDS fueron mejores que los obtenidos con LiHMDS.



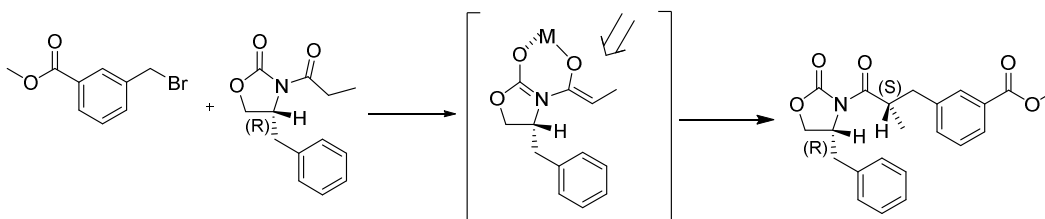
Reactivos y condiciones: (i) NaHMDS 1.0 M, 3-bromometilbenzoato de metilo, THF anh, -78 °C, 7 h. 62 %

Esquema 4. Síntesis del compuesto **24**.

<sup>60</sup> Miyachi, H.; Nomura, M.; Tanase, T.; Takahashi, Y.; Ide, T.; Tsunoda, M.; Murakami, K.; Awano, K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, 12, 77.

Para la determinar la configuración del centro quiral se han llevado a cabo cálculos teóricos y experimentos de NOE selectivos; los resultados determinaron que la configuración de dicho centro es (*S*), (*S,R*)-**24**, con un 95 % de ee.<sup>61</sup>

El uso de NaHMDS a -78 °C favoreció la formación del enolato-metal de configuración *Z* y el uso de un sustrato electrófilo con elevado impedimento estérico ha favorecido la estereoselectividad de la reacción. El quelato es rígido y la conformación queda retenida por lo que las dos caras resultan estéricamente definidas. El grupo bencilo en posición 4 del anillo de oxazolidinona induce el ataque por la cara menos impedida obteniéndose finalmente la configuración absoluta (*S*) del nuevo centro quiral (Esquema 5)

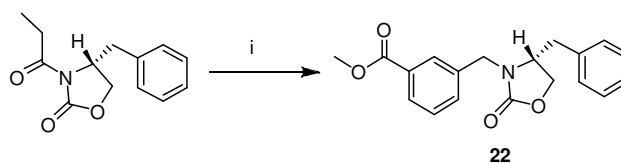


Esquema 5. Obtención de la configuración (*S*) del compuesto **24**.

### Síntesis del compuesto **22**

A partir de la *N*-aciloxazolidinona y modificando las condiciones experimentales utilizando *tert*-butóxido potásico a temperatura ambiente se obtuvo el derivado **22** como producto mayoritario de la síntesis (Esquema 6).

<sup>61</sup> Fresno, N.; Pérez-Fernández, R.; Goya, P.; Jimeno, M. L.; Alkorta, I.; Elguero, J.; Menéndez-Taboada, L.; García-Granda, S. *Tetrahedron* **2011**, 67, 9104.



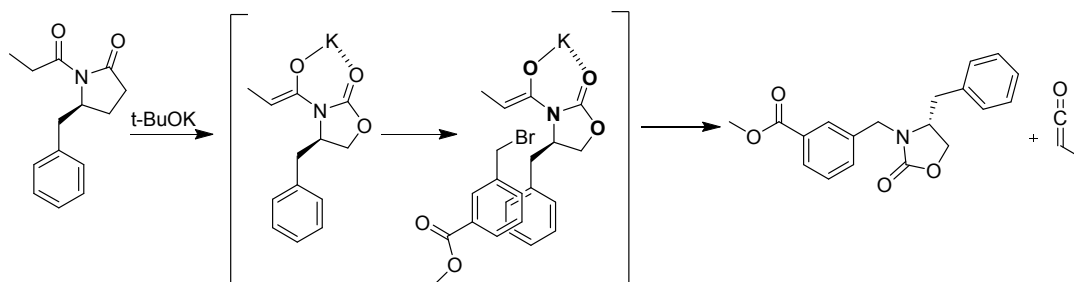
Reactivos y condiciones: (i)  $t\text{BuOK}$ , 3-bromometilbenzoato de metilo, THF anh, t.a., 7 h.

62 %.

Esquema 6. Síntesis derivado **22**.

Como se observa en el Esquema 6, el derivado **22** ha perdido un grupo propiónico en comparación al compuesto **24**; esta hipótesis inicial se confirmó con estudios de resonancia magnética nuclear y el análisis cristalográfico de la estructura de rayos X obtenida de dicho compuesto.

Tras dilucidar la estructura del derivado **22** se propuso el siguiente mecanismo (Esquema 7). Este consiste en una primera etapa de desprotonación del hidrógeno en posición  $\alpha$ , en presencia de *tert*-butóxido potásico; a continuación, la adición del derivado bromado da lugar a la eliminación del grupo ceteno y al posterior ataque nucleófilo del anión oxazolidinona al derivado bromado.



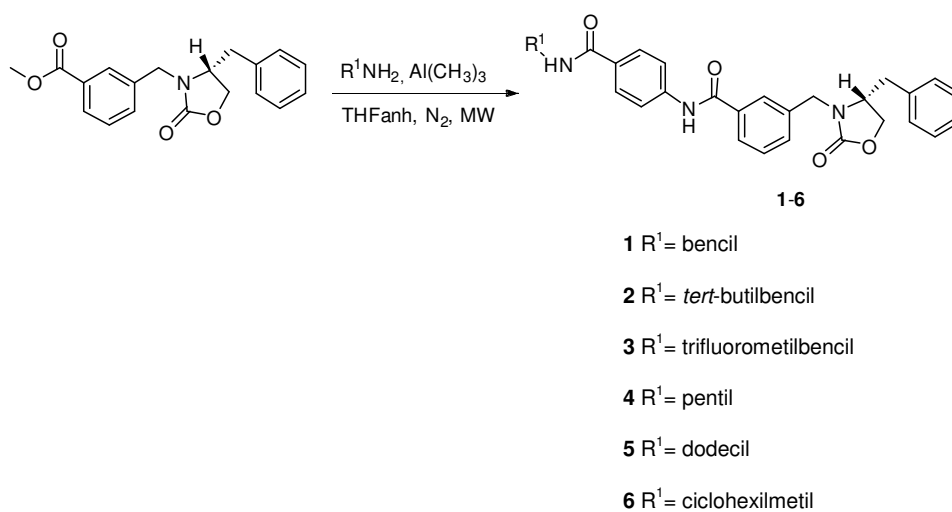
Esquema 7. Mecanismo propuesto para la obtención de **22**.

Una manera alternativa de obtener **22** fue por reacción del (*R*)-4-bencil-2-oxazolidinona con 3-(bromometil)benzoato de metilo en presencia de <sup>t</sup>BuOK a temperatura ambiente. En este caso, el derivado *N*-aciloxazolidinona **22** se obtuvo con rendimientos comparables a los obtenidos en la síntesis inicial, lo que confirma sin ninguna duda la estructura propuesta.

#### *Síntesis de los productos finales 1-6*

Para la síntesis de los diferentes derivados se ha utilizado la formación de enlaces amida a partir de ésteres en presencia de trimetilaluminio, el cual es un método alternativo a la activación de ácidos carboxílicos descrito en la literatura. El trimetilaluminio es un ácido de Lewis utilizado en una amplia variedad de reacciones, que facilita el ataque nucleófilo sobre el carbono carbonílico tras la activación del átomo de oxígeno. La reacción se ve favorecida por la formación de un complejo de aluminio en el que el átomo de aluminio se aproxima al oxígeno y al nitrógeno de la amina correspondiente. La síntesis se llevó a cabo en un reactor de microondas. Se hizo reaccionar el derivado **22** con las aminas correspondientes **16-21** obteniéndose los productos deseados **1-6** (Esquema 8).





Reactivos y condiciones: i) R¹NH₂, Al(CH₃)₃, THF, 125 °C, 20 min.

Esquema 8. Síntesis compuestos **1–6**.

Cuando se intentó la formación del enlace amida con el derivado **24** no se obtuvo en ninguno de los casos el producto deseado. Una de las hipótesis planteadas sugiere que la presencia del grupo carbonilo en el derivado **24** podría competir con el éster metílico por la coordinación con el ácido de Lewis dificultando la síntesis (Figura 14).

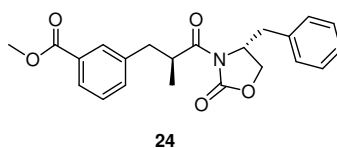
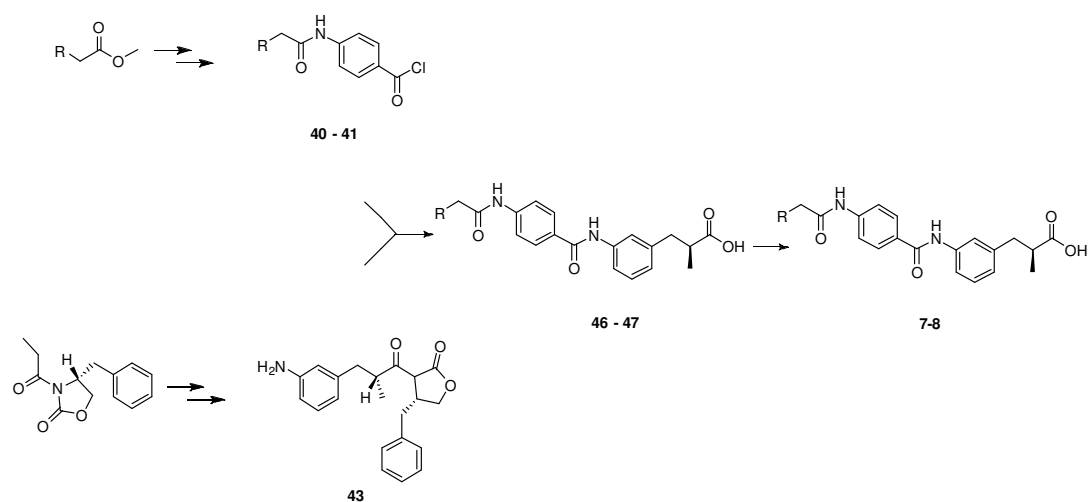


Figura 14. Compuesto **24**.

Con el fin de mantener el auxiliar quiral se llevaron a cabo diferentes alternativas de síntesis sin éxito. Para obtener ácidos quirales  $\alpha$ -fenilpropiónicos se diseñó una nueva metodología que dio lugar a los compuestos de la serie 2.

#### 1.2.1.2.2. Síntesis de la serie 2

La sustitución del éster metílico por la amina en el producto **27** permitió la obtención de los derivados **7** y **8** (Esquema 9).

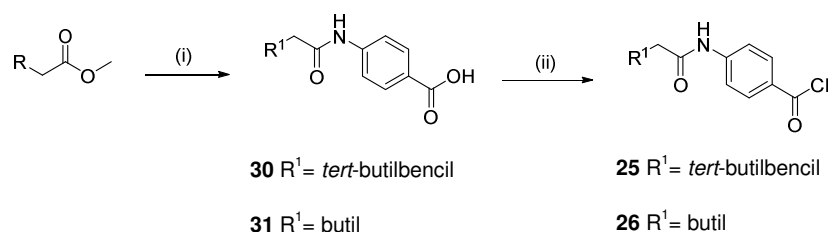


Esquema 9. Síntesis compuestos **7** y **8**.

#### *Síntesis de los compuestos 25 y 26*

Los compuestos **30** y **31** se prepararon por reacción bajo condiciones de microondas del correspondiente éster metílico con ácido 4-aminobenzoico en

presencia de trimetilaluminio. En una segunda etapa, se llevó a cabo la formación de los cloruros de ácido **25** y **26** (Esquema 10).

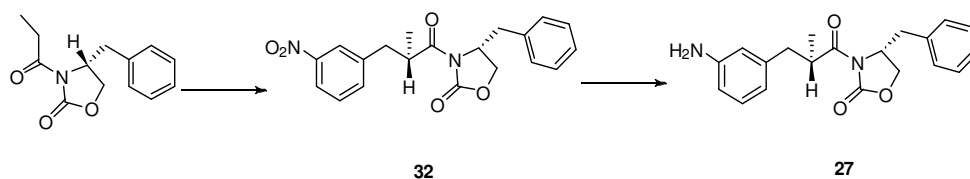


Reactivos y condiciones: (i) ácido 4-aminobenzoico, 125 °C, 20 min. (ii)  $\text{SOCl}_2$ , 80 °C, 6 h.

Esquema 10. Síntesis compuestos **25** y **26**.

### Síntesis del compuesto **27**

Como se observa en el Esquema 11 el compuesto **27** se consiguió tras dos etapas de síntesis.



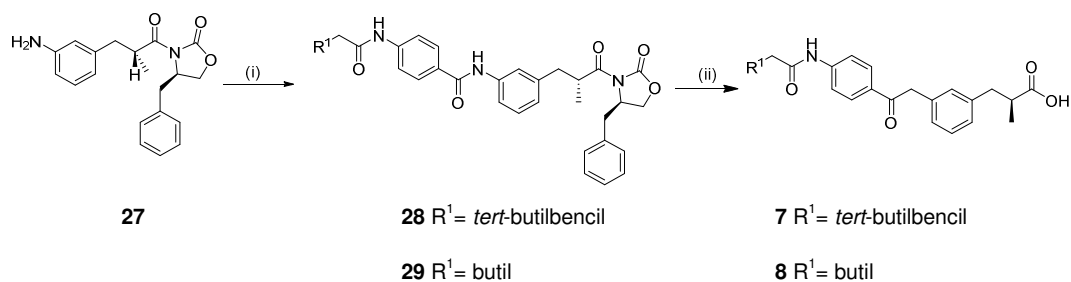
Reactivos y condiciones: (i) NaHMDS, 1-(bromometil)-3-nitrobenceno, -78 °C, 6 h. (ii)  $\text{H}_2/\text{Pd-C}$ , 21 psi, t.a.

Esquema 11. Síntesis derivado **27**.

En un primer lugar, se llevó a cabo la reacción entre la (*R*)-4-bencil-3-propioniloxazolidin-2-ona y 1-(bromometil)-3-nitrobenzono bajo las condiciones anteriormente descritas de temperatura, obteniéndose el derivado **32** con la configuración absoluta determinada (*S*). A continuación, tras una etapa de hidrogenación en condiciones suaves se obtuvo el derivado **27**.

#### *Síntesis de los compuestos finales 7 y 8*

Los derivados **7** y **8** se sintetizaron a partir de los intermedios **28** y **29**. Para ello, se lleva a cabo la formación del enlace amida entre el derivado **27** y los correspondientes cloruros de ácido **25** y **26**, obteniéndose los derivados **28** y **29** con rendimientos moderados. Finalmente, tras la reacción con LiOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se aislaron los correspondientes α-ácidos carboxílicos **7** y **8** (Esquema 12).



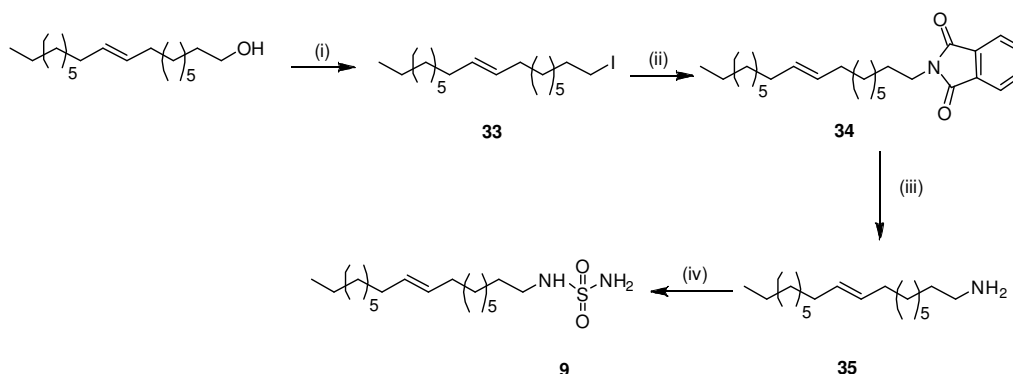
Reactivos y condiciones: (i) **25-26**, Et<sub>3</sub>N, 12 h, t.a. (ii) LiOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0 °C – t.a., 6 h.

Esquema 12. Síntesis de derivados **7** y **8**.

### 1.2.1.2.3. Síntesis de la Elaidilsulfamida 9

En un trabajo previo de nuestro grupo, se había descubierto que derivados de sulfamidas de ácidos grasos de configuración *trans*, estructuralmente relacionados con la OEA (ligando endógeno de PPAR $\alpha$ ), eran capaces de activar este receptor y además, de reducir ingesta en ratas. Posteriormente, se identificó el isómero *trans*, la elaidilsulfamida (ES) como compuesto interesante,<sup>62</sup> por lo que en esta tesis se ha optimizado su síntesis y estudiado su actividad farmacológica.

Para la síntesis de la ES (**9**) se siguió el siguiente esquema general de reacción (Esquema 13).



Reactivos y condiciones: (i) PPh<sub>3</sub>, I<sub>2</sub>, imidazol, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt. (ii) Ftalimida potásica, DMF, 80°C, 5 h. (iii) NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, HCl, MeOH, reflujo, 4 h. (iv) sulfamida, H<sub>2</sub>O/EtOH, reflujo, 4 días.

Esquema 13. Síntesis de la ES (**9**).

<sup>62</sup> Cano, R. C.; Goya-Laza, M. P.; Macias, G. M.; Paez, P. J. A.; Pavon, M. J.; WO Patent App. PCT/EP2007/000,681: 2007.

En una primera etapa se utiliza la reacción de Appel para la halogenación del *trans*-octadecen-9-ol en condiciones suaves, obteniéndose **33**. En la siguiente etapa se lleva a cabo la síntesis de Gabriel por alquilación de la ftalimida potásica a través de un mecanismo  $SN_2$  obteniéndose **34**, y su posterior hidrólisis con hidracina da lugar a la amina primaria **35**. Finalmente, por reacción de **35** con sulfamida se obtiene el derivado **9**.

#### 1.2.1.3. Estudios de “Docking”

El “docking” es una aproximación computacional utilizada como herramienta para estudiar el modo de unión de las moléculas a la proteína objetivo que se puede aplicar al diseño de nuevos fármacos y también a explicar la actividad de los mismos.

Con el fin de conocer la localización y las diferentes interacciones importantes para la transcripción del receptor PPAR $\alpha$  se han llevado a cabo los estudios de “docking” de los derivados **1-9** y WY-14643.

##### *“Docking” PPAR $\alpha$ : serie 1*

Para la validación del modelo teórico se ha utilizado la estructura cristalina experimental del compuesto GW409544 (verde) unido al dominio de unión del ligando (LBD) del PPAR $\alpha$  obtenido de la base de datos de proteínas PDB

(1K7L).<sup>63</sup> Conforme a la estructura cristalina, los anillos aromáticos de GW409544 estabilizan las interacciones con los aminoácidos no polares del LBD. Además, la conformación que adopta el ligando GW409544 en el interior del receptor permite que el grupo carboxilato forme enlaces de hidrógeno con Ser-280, Tyr-314, His-440 y Tyr-464 pertenecientes a la Hélice AF2 (rojo). Estos enlaces de hidrógeno favorecen la estabilización de dicha hélice lo que da lugar a la activación transcripcional de PPAR $\alpha$ . Como segunda referencia se ha llevado a cabo el “docking” de WY-14643 (PPAR $\alpha$  agonista) (gris), que ha sido utilizado como control positivo en ensayos posteriores de ingesta *in vivo* (Figura 15).

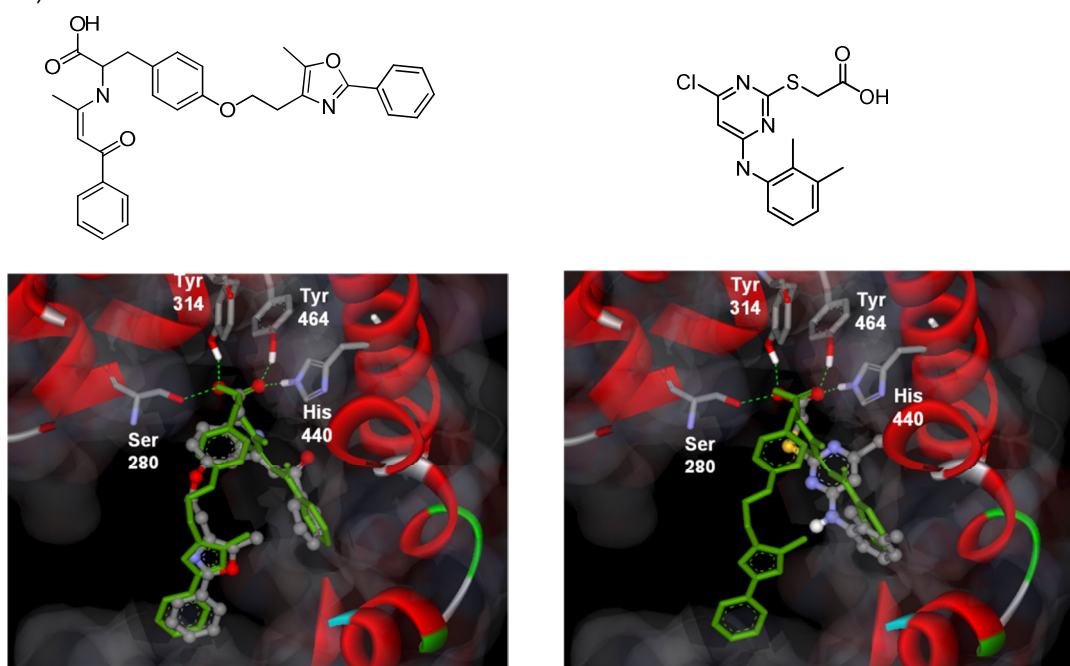


Figura 15. “Docking” de los ligandos de referencia.

<sup>63</sup> Xu, H. E.; Lambert, M. H.; Montana, V. G.; Plunket, K. D.; Moore, L. B.; Collins, J. L.; Oplinger, J. A.; Kliewer, S. A.; Gampe Jr, R. T.; McKee, D. D. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, 98, 13919.

Se ha llevado a cabo el “docking” de los derivados **2**, **3**, **4** y **6** que pueden considerarse representativos de la serie 1. Como se observa en la Tabla 1, las energías de “docking” de los diferentes compuestos son similares mejorando en todos los casos la energía del ligando de referencia WY. Los derivados **2** y **3** presentan mayor similitud estructural ya que poseen un resto aromático en la parte lipófila de la molécula. Estos derivados presentan 4 conformaciones que forman enlaces de hidrógeno con la Tyr-464, pero para el derivado **3** la mejor conformación se estabiliza tan solo con 2 interacciones polares. Esto podría afectar a la actividad agonista del ligando ya que estas interacciones con los residuos del LBD-PPAR $\alpha$  son fundamentales para la estabilización de la hélice 12 (Figura 16).

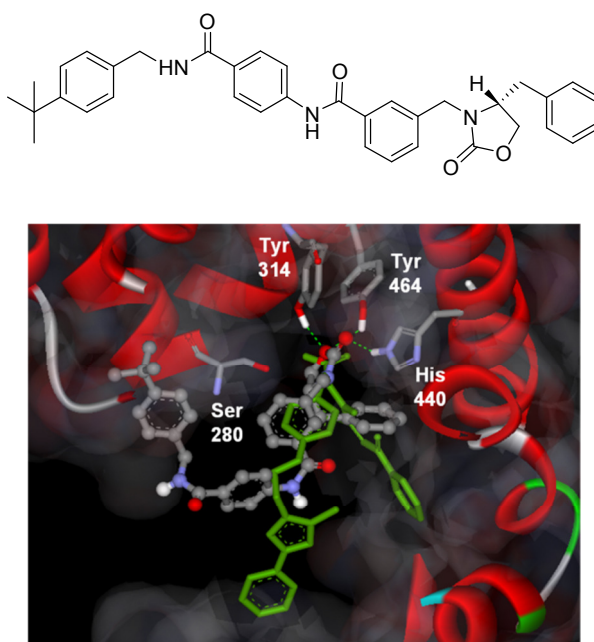


Figura 16. “Docking” del compuesto **2**.



El compuesto **4** es el que presenta mayor número de conformaciones que forman enlaces de hidrógeno con Tyr-464, y estas además están estabilizadas por la interacción con His-440 presente en el sitio activo (Figura 17).

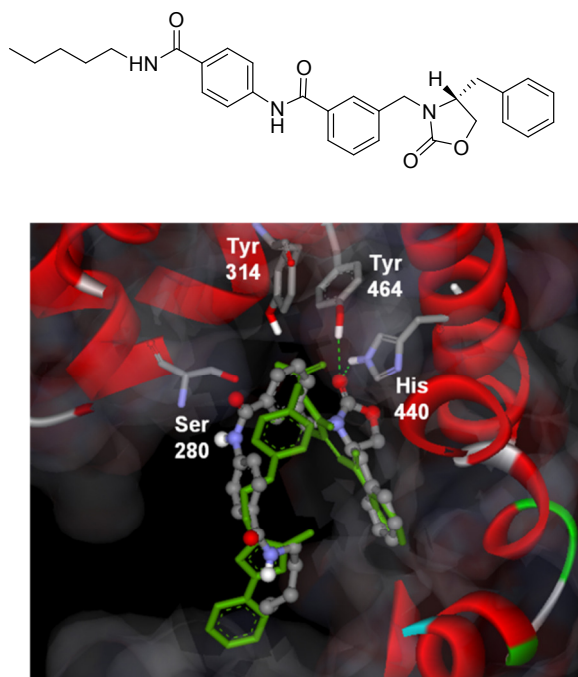


Figura 17. “Docking” del compuesto **4**.

Como se observa en la Figura 17, el compuesto **4** se ajusta al extremo apolar del ligando de referencia GW, lo que le permite encajar muy bien en el LBD. Finalmente, el derivado **6** presenta pocas conformaciones que establezcan enlaces de hidrógeno con Tyr-464.

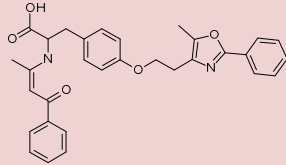
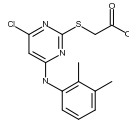
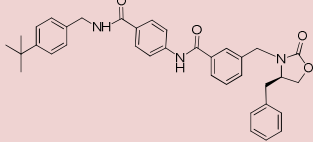
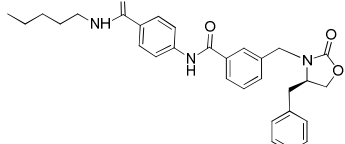
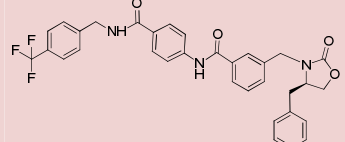
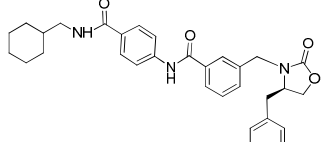
Compuesto	Estructura	Energía "docking" (kca/mol)	Enlaces H Tyr-464	Interacciones polares
GW409544 (Rayos X)		-18.25	31	Ser-280 Tyr-314 Tyr-464 His-440
WY-14643		-8.99	63	Ser-280 Tyr-314 Tyr-464 His-440
2		-10.68	4	Tyr-314 Tyr-464 His-440
4		-11.54	12	Tyr-464 His-440
3		-11.93	4	Tyr-464 His-440
6		-12.24	3	Tyr-314 Tyr-464 His-440

Tabla 1. Energías de "docking" de los compuestos **2**, **3**, **4** y **6**.

*"Docking" PPAR $\alpha$ : serie 2*

Como se observa en la Figura 18 y la Figura 19 los compuestos **7** y **8** establecen interacciones con el residuo de Tyr-464 y el resto de los residuos polares

importantes del LBD-PPAR $\alpha$ , ambos presentan energías de “docking” similares de -11.61 y -9.99 kcal/mol, respectivamente.

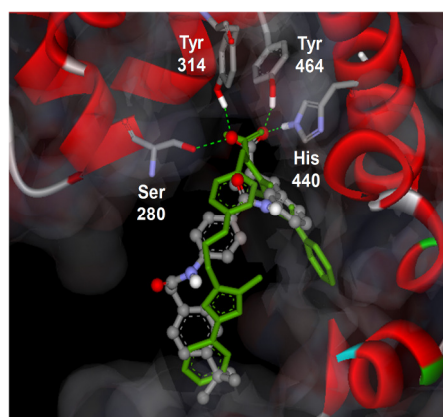
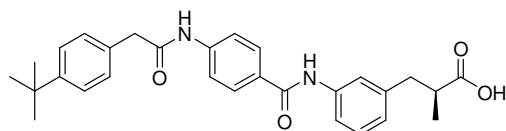


Figura 18. “Docking” del compuesto 7.

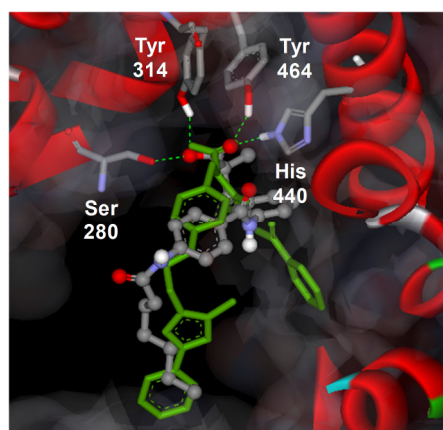
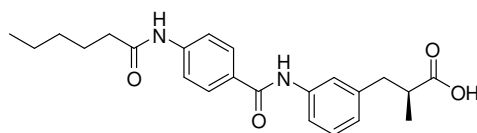


Figura 19. “Docking” del compuesto 8.

En resumen, el análisis de todos los resultados obtenidos confirma que el carbonilo del anillo de oxazolidinona es el responsable de las interacciones con la Tyr-464 del LBD-PPAR $\alpha$ , la cual es fundamental para la activación transcripcional del receptor. El fenilo central presente en los diferentes derivados encaja perfectamente en el bolsillo aromático del centro activo, esta disposición es característica del “docking” de los dos ligandos de referencia. Finalmente, el sustituyente en la posición 4 del anillo de oxazolidinona es importante para la activación del receptor. El bencilo además de ajustarse en el bolsillo aromático, es el encargado de orientar al carbonilo hacia los residuos polares del LBD, estableciéndose así las interacciones más importantes para desencadenar la transcripción.

*“Docking PPAR $\alpha$ ”: elaidilsulfamida (9)*

Se ha llevado a cabo el “docking” de la OEA y la ES utilizando la misma estructura cristalográfica experimental que en casos anteriores, GW409544-LBD-PPAR $\alpha$ , para la validación del ensayo. Como se observa en la Figura 20, la cadena acíclica de la OEA y ES ocupan la misma región hidrofóbica que el ligando de referencia. Por otro lado, los grupos polares CO y SO<sub>2</sub> son los encargados de establecer los enlaces de hidrógeno con el resto hidroxilo de la cadena lateral de Tyr-464. Esta interacción es estabilizada con los diferentes enlaces de hidrógeno formados con Ser-280, Tyr-314 y His-440 (ES) y Ser-280 y His-440 (OEA).

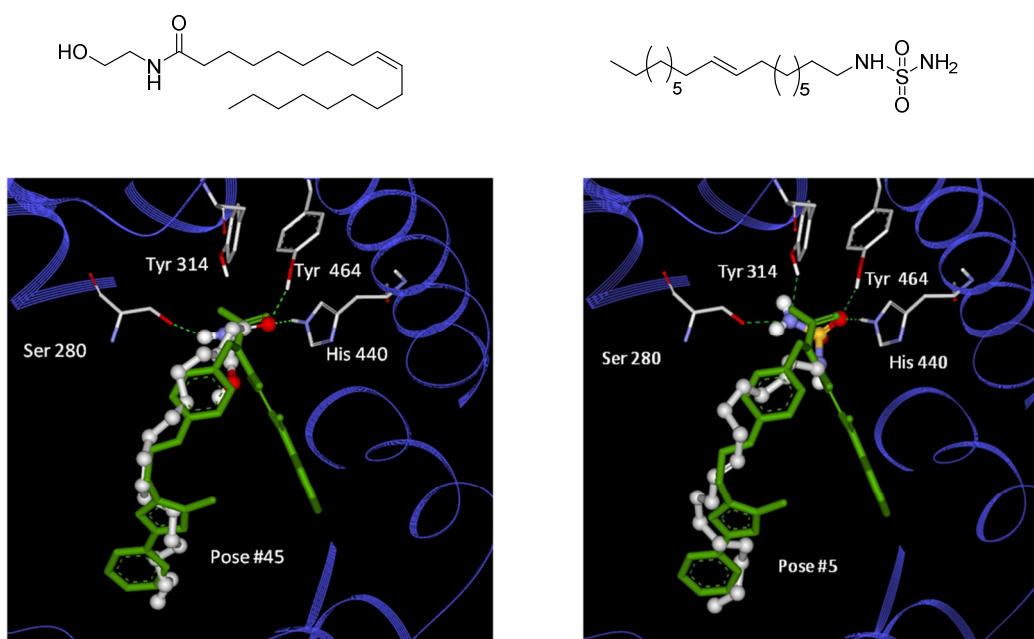


Figura 20. “Docking” OEA (izquierda) y ES (derecha).

#### 1.2.1.4. Farmacología

La evaluación farmacológica tanto *in vitro* como *in vivo* de los nuevos ligandos PPAR se ha llevado a cabo en IBIMA (Instituto de Investigación Biomédicas de Málaga) dentro del CIBER de Obesidad y Nutrición (OBN).

##### Ensayos *in vitro*

Como se ha demostrado existe una gran similitud estructural entre PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$  y una implicación directa de ambas isoformas en las diferentes alteraciones del síndrome metabólico. Por dichos motivos se han llevado a cabo los ensayos biológicos tanto PPAR $\alpha$  como PPAR $\gamma$ .

*Transfección celular y ensayo del gen indicador de luciferasa (reporter gene assay).*

El ensayo "reporter gene assay" es un método *in vitro* utilizado para determinar y cuantificar la existencia de interacciones físicas entre proteínas, siendo útil para confirmar, en nuestro caso, la interacción del factor de transcripción PPAR- $\alpha$  y el coactivador SRC-1 en células MCF-7.

Para determinar la actividad y capacidad agonista sobre PPAR $\alpha$  de **1-9** se llevó a cabo el ensayo de interacción proteína-ADN utilizando diferentes concentraciones de estos ligandos. Este ensayo de quimioluminiscencia permite una determinación cuantitativa de la actividad luciferasa en células transfectadas. La reacción catalizada por la luciferasa transforma la luciferina en oxiluciferina en presencia de ATP, Mg<sup>2+</sup> y O<sub>2</sub>, y produce además fotones de luz visible (Figura 21).

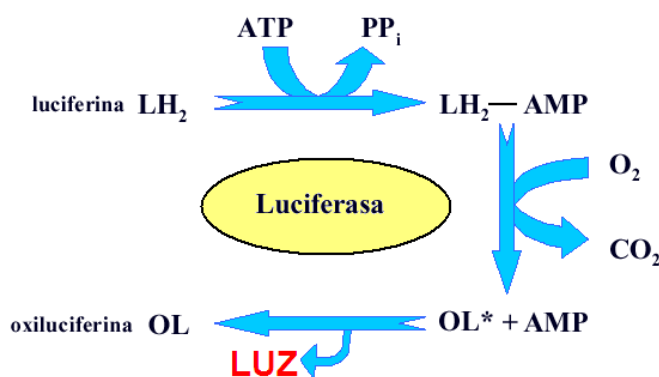


Figura 21. Reacción catalizada por la luciferasa. LH<sub>2</sub>: luciferina; OL: oxiluciferina.

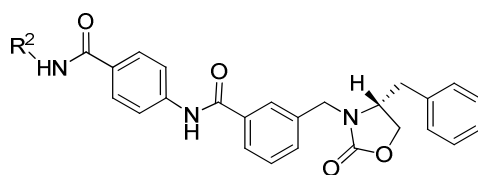
Como controles se usaron la OEA (PPAR $\alpha$  agonista) y la anandamida como control positivo y control negativo, respectivamente.

*Ensayos de interacción de proteína PPAR $\gamma$  con PPRE y luciferasa*

La metodología para este ensayo es similar a la anteriormente descrita para PPAR $\alpha$ . La diferencia principal se encuentra en el proceso de transfección celular, en este caso se adicionan liposomas con plásmidos de PPAR $\gamma$  en lugar de plásmidos de PPAR $\alpha$ .

*SERIE 1*

Como se observa en la Tabla 2 de todos los compuestos ensayados, los derivados **2** y **4** mostraron actividad frente a luciferasa demostrándose por tanto su capacidad agonista.



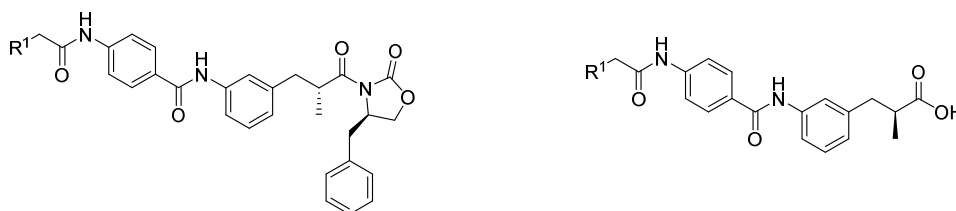
COMPUESTO	R <sup>2</sup>	PPAR $\alpha$ EC <sub>50</sub> (nM)	PPAR $\gamma$ EC <sub>50</sub> (nM)
OEA		152±31	-
WY14643		650±134	-
<b>1</b>	bencil	>10 <sup>-4</sup> M	>10 <sup>-4</sup> M
<b>2</b>	<i>tert</i> -butilbencil	670±157	1298±261
<b>3</b>	trifluorometilbencil	>10 <sup>-4</sup> M	>10 <sup>-4</sup> M
<b>4</b>	Pentil	821±139	1622±388
<b>5</b>	Dodecil	6623±1232	>10 <sup>-4</sup> M
<b>6</b>	ciclohexilmetil	>10 <sup>-4</sup> M	>10 <sup>-4</sup> M

Tabla 2. Valores de EC<sub>50</sub> PPAR $\alpha$  compuestos **1-6**.

Ambos derivados presentan una  $EC_{50}$  en el rango nanomolar siendo comparable a la actividad del compuesto sintético WY146443 utilizado como referencia. Ambos derivados, **2** y **4**, también poseen actividad agonista por  $PPAR\gamma$ , si bien en este caso la  $EC_{50}$  está en el rango micromolar.

### SERIE 2

Como se indica en la Tabla 3 tanto los derivados **7** y **8** como los precursores de síntesis **28** y **29** dieron lugar a una actividad relativa luciferasa en el rango nanomolar, mostrando su actividad como agonistas  $PPAR\alpha$ .



COMPUESTOS	R <sup>1</sup>	PPAR $\alpha$ EC <sub>50</sub> (nM)
<b>28</b>	<i>tert</i> -butilfenil	966±233
<b>29</b>	butil	1922±408
<b>7</b>	<i>tert</i> -butilfenil	866±188
<b>8</b>	butil	

Tabla 3. Valores de  $EC_{50}$   $PPAR\alpha$  compuestos **28**, **29**, **7** y **8**.

### Elaidilsulfamida (**9**)

Ensayo *in vitro* de precipitación proteína-proteína de fusión con glutathion-sulfuro-transferasa (GST-pull down).



Los ensayos proteómicos con *GST-pull down* permiten obtener los perfiles de interacción de PPAR $\alpha$  humano marcado con [ $^{35}$ S] con coactivadores fusionados a GST, en presencia del compuesto que pudiera actuar como ligando del receptor.

El ensayo se ha llevado a cabo en presencia de OEA y WY14653 como ligandos PPAR $\alpha$  agonistas y el compuesto ES (**9**) a una concentración 1  $\mu$ M. Como se observa en la Figura 22 ES indujo una interacción significativa de PPAR $\alpha$  humano con TIF2 (coactivador) respecto al grupo control (DMSO).

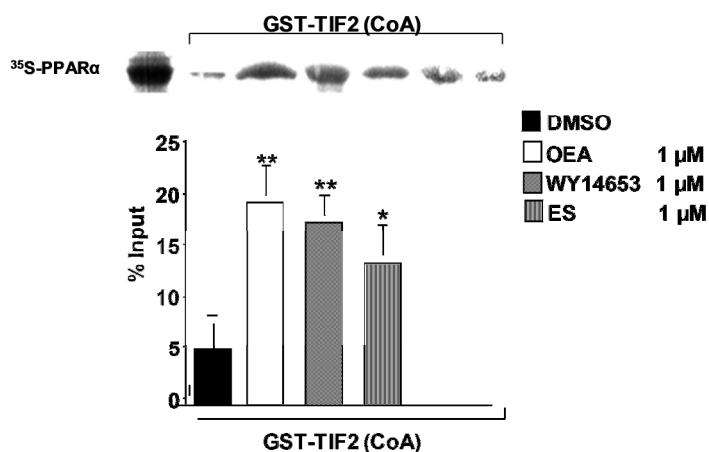


Figura 22. Ensayos proteómicos con *GST-pull down* del compuesto ES (**9**).

### Ensayos in vivo

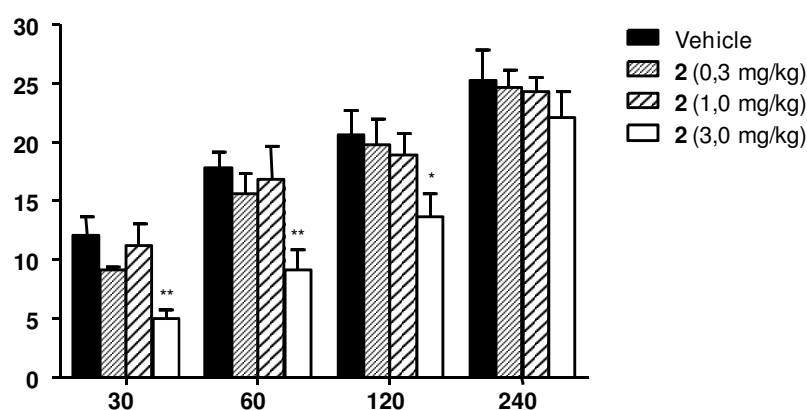
#### *Estudios de ingesta de comida: tratamiento agudo*

Para los estudios de ingesta de comida se utilizaron ratas Wistar, la administración del fármaco se realiza por vía intraperitoneal (i.p) y se pesa la cantidad de comida consumida.

*SERIE 1*

Los derivados **2** y **4** presentaron buenos resultados en los ensayos *in vitro* y por ello fueron seleccionados como candidatos para los ensayos *in vivo*.

El compuesto **2** mostró una disminución en la ingesta de manera dosis-dependiente frente al grupo control. Si bien las dosis de 0.03 y 0.3 mg/kg no causaron una disminución significativa, la dosis de 3 mg/kg produjo dicha disminución hasta 120 min después de su administración (Figura 23).

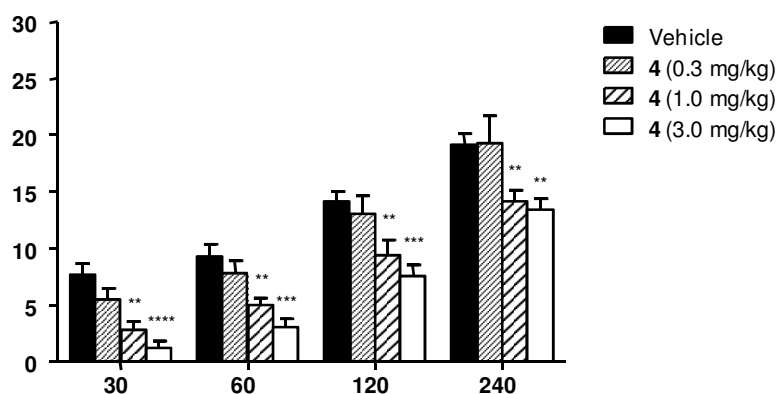


Consumo de comida (g) tras 15 min de la administración aguda i.p. de **2** con diferentes dosis (0.03, 0.3, 3 mg/kg) a ratas *Wistar* privadas de comida 24 h. Las barras muestran las medias  $\pm$  SEM (N=), análisis *post hoc* T-Student (*F*-Snedecor). (\*) $P < 0.05$ , grupo tratado versus vehículo.

Figura 23. Estudios agudos de ingesta del compuesto **2**.

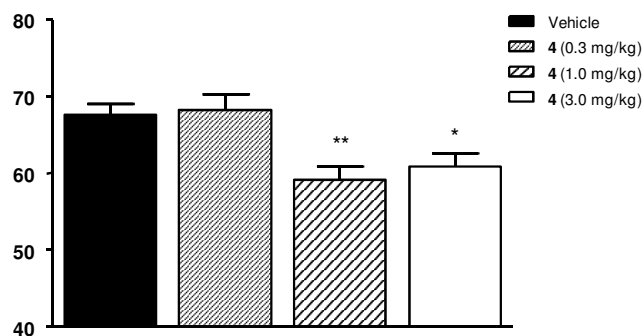
Como se observa en la Figura 24, el compuesto **4** presentó una disminución del consumo de comida de manera dosis dependiente una de las diferencias con el derivado anterior es que en este caso dicho efecto anorexigénico se produce a dos dosis (1.0 y 3.0 mg/kg). Ambas dosis de **4** provocaron una disminución en la ingesta de comida frente al grupo control que llegó a ser significativa a los 30,

60, 120 y 240 min. Ante estos resultados se decidió completar los ensayos llevando a cabo el experimento una vez transcurrido 24 h, y como se observa en la Figura 25 el compuesto sigue siendo activo en la reducción de ingesta.



Consumo de comida (g) tras 15 min de la administración aguda i.p. de **4** con diferentes dosis (0.03, 0.3, 3 mg/kg) a ratas *Wistar* privadas de comida 24 h. Las barras muestran las medias  $\pm$  SEM (N=), análisis *post hoc* T-Student (*F*-Snedecor). (\*) $P < 0.05$ , grupo tratado versus vehículo.

Figura 24. Estudios agudos de ingesta del compuesto **4**.



Resultados sobre ingesta a las 24 horas de administrar el compuesto **4**. Se presentan los valores normalizados por gramo de comida consumido con respecto de kg de animal. El compuesto sigue siendo activo a las 24 horas de forma dosis-dependiente.

Figura 25. Estudios agudos de ingesta a las 24 h del compuesto **4**.

*Elaidilsulfamida (9).*

Como se observa en la Figura 26, la administración de elaidilsulfamida induce una disminución de ingesta de comida de forma dosis-dependiente de manera similar a la de los derivados **2** y **4**. La dosis de 3 mg/kg de ES es efectiva hasta los 60 min.

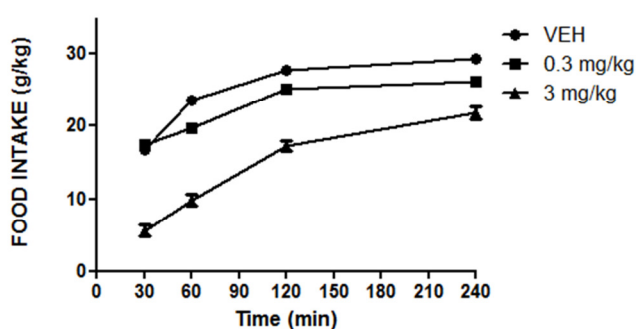


Figura 26. Estudios agudos de ingesta del compuesto **9**.

Tabla 4 se recogen los valores de  $IC_{50}$  de los isómeros *cis* y *trans*, oleil y elaidiletanolamida, OEA y EEA y los de las correspondientes sulfamidas, oleilsulfamida (OS) y elaidilsulfamida (ES (**9**)).

COMPUESTO	$IC_{50}$	95 % CI
OEA	4.32	3.2-5.7
EEA	8.47	5.8-12.6
ES	2.05	1.6-2.5
OS	10.94	5.8-12.6

Tabla 4. Valores de  $IC_{50}$  de los compuestos OEA, EEA, ES y OS.

La ES es más potente que el ligando natural OEA mientras que la EEA y la OS muestran una potencia similar pero claramente inferior a la del ligando natural.

Además de los estudios de ingesta se han llevado a cabo otros ensayos farmacológicos que no se detallan en esta memoria pero que se pueden resumir en los siguientes puntos: Aparte de disminuir ingesta de manera significativa, la ES (9) reduce la ganancia de peso en ratas obesas tras tratamiento continuado.

La administración de ES (9) reduce los niveles de colesterol en plasma y mejora la actividad de las transaminasas.

Ahora bien, la administración crónica de ES (9) induce resistencia a la insulina como se pone de manifiesto en la hiperglicemia observada tras siete días de tratamiento lo que supone una limitación al desarrollo de la ES (9) como potencial fármaco anti-obesidad.<sup>64</sup>

### 1.2.2. DISEÑO DE LIGANDOS DUALES PPAR/CB

Desde la retirada del Rimonabant en 2008 por sus efectos adversos, se han realizado numerosos cambios estructurales con el objetivo de reducir sus efectos centrales y obtener nuevas moléculas para el tratamiento de la obesidad.<sup>65</sup> Por otro lado, el fenofibrato es utilizado ampliamente en clínica para el tratamiento de dislipemia, aunque debido a su baja eficacia son necesarias dosis elevadas para

---

<sup>64</sup> Decara, J. M.; Romero-Cuevas, M.; Rivera, P.; Macias-González, M.; Vida, M.; Pavón, F. J.; Serrano, A.; Cano, C.; Fresno, N.; Pérez-Fernández, R. *Disease Models & Mechanisms* **2012**, 5, 660.

<sup>65</sup> Serrano, A.; Pavon, F. J.; Suarez, J.; Romero-Cuevas, M.; Baixeras, E.; Goya, P.; de Fonseca, F. R. *Current Obesity Reports* **2012**, 1, 216.

obtener el efecto terapéutico deseado. En este contexto, se han diseñado ligandos duales en los que se ha incorporado en una única molécula ambos farmacóforos, el fenofibrato (PPAR $\alpha$  agonista) y el esqueleto 1,5 diarilpirazol procedente del Rimonabant, (CB1 antagonista). Para ello, se ha utilizado el diseño de ligandos múltiples (DML) como estrategia (Figura 27) obteniéndose los derivados **36-39**.

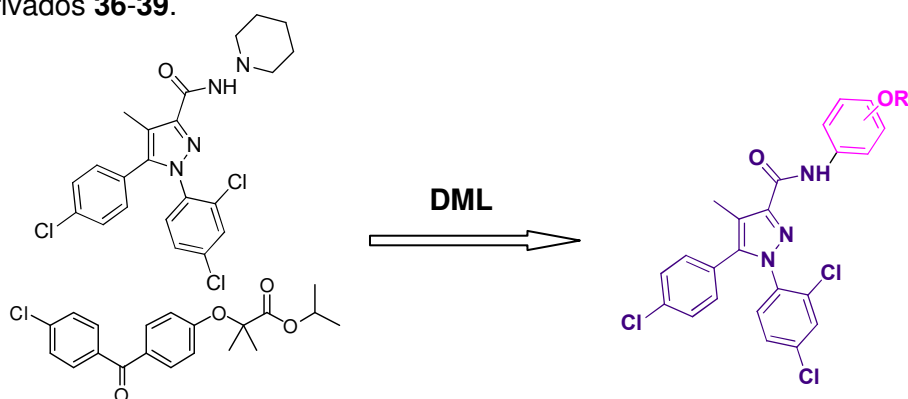


Figura 27. Diseño de ligandos múltiples: fusión

#### 1.2.2.1. Síntesis de derivados 1,5 diarilpirazoles 36-46

Con el fin de llevar a cabo un estudio estructura- actividad dual se han realizado modificaciones en la posición R<sup>1</sup> de la estructura general (Figura 28). Como se indica a continuación, se han incorporado anillos aromáticos y grupos alquílicos cíclicos diferentemente sustituidos, con el fin de conocer la importancia de los grupos hidroxilo y éster para la actividad dual. Por otro lado, se han incorporado cadenas alquílicas de tres y cuatro grupos metilenos, manteniendo así la separación de los grupos funcionales de los derivados cíclicos. Estas últimas modificaciones han permitido conocer la implicación del impedimento estérico inducido por dichos sustituyentes.

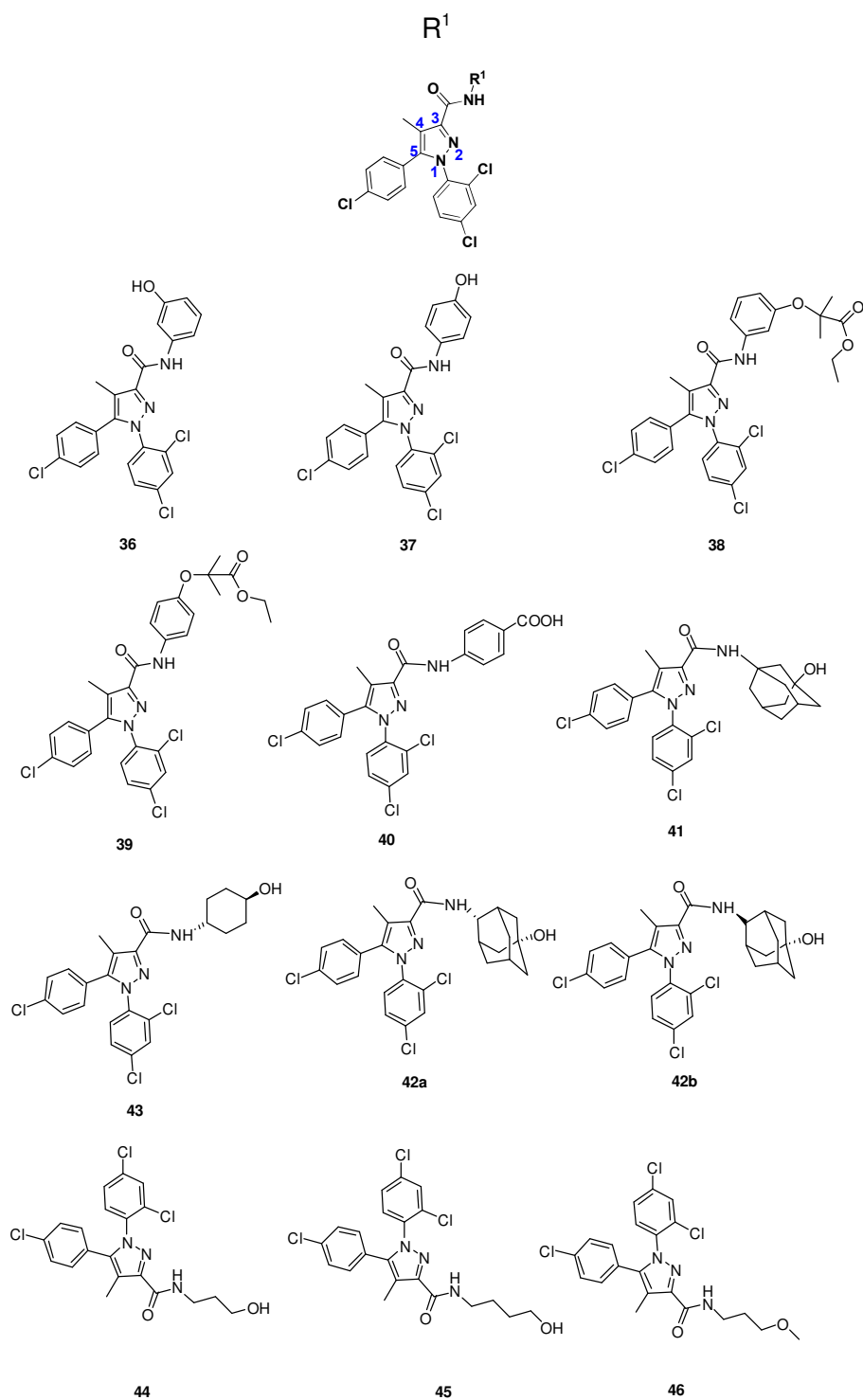
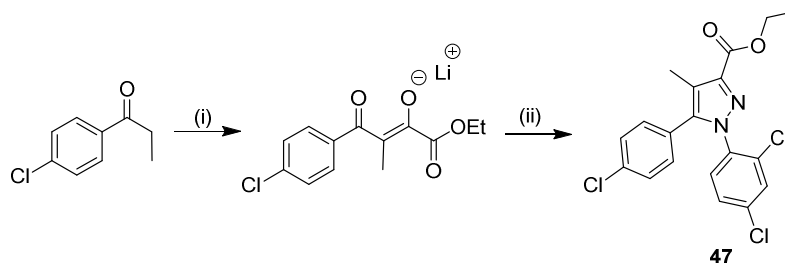


Figura 28. Derivados 1,5 diarilpirazoles **36-46**.

Así pues se ha preparado una serie de derivados de 1,5-diarilpirazoles con el fin de evaluar su actividad farmacológica dual CB1/PPAR $\alpha$  y CB1/PPAR $\alpha/\gamma$ , y de estudiar mediante técnicas de “docking” las interacciones principales que se establecen con los residuos polares del dominio de unión del PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ .

El producto de partida para la obtención de los compuestos **36-46** es el 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxilato de etilo **47**, precursor del Rimonabant. Su síntesis se ha desarrollado siguiendo la metodología más reciente descrita en la literatura,<sup>66</sup> que consiste en hacer reaccionar la 4-cloropropiofenona en presencia de LiHMDS con dietiloxalato para dar la correspondiente sal de litio. Esta reacciona con 2,4-diclorofenilhidrazina proporcionando el compuesto **47** con rendimientos moderados (Esquema 14).



Reactivos y condiciones: (i) LiHMDS 1.0 M en hexano, dietiloxalato, metilciclohexano, t.a., 2 h 30 min. 24 %. (ii) 2,4-diclorofenilhidrazina, EtOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:1), reflujo, 12 h. 52 %.

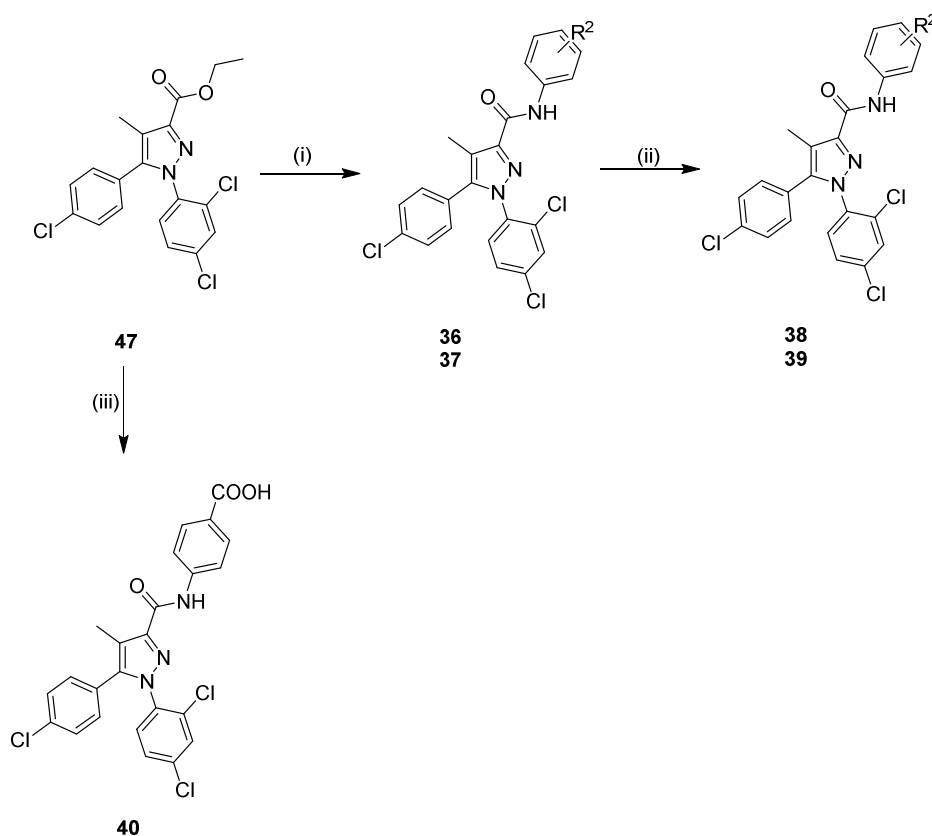
Esquema 14. Síntesis del compuesto **47**.

<sup>66</sup> Kotagiri, V. K.; Suthrapu, S.; Mukunda Reddy, J.; Prasad Rao, C.; Bollugoddu, V.; Bhattacharya, A.; Bandichhor, R. *Organic Process Research & Development* **2007**, *11*, 910.



*Síntesis de derivados 1,5-diarilpirazoles aromáticos (36-40)*

La síntesis de los derivados **36**, **37** y **40** se llevó a cabo en un reactor de microondas.



Reactivos y condiciones: (i) 3 o 4-aminofenol,  $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$  2.0 M en heptano, THF, 125 °C, 3 min 30 s; (ii) 2-bromo-2-metilpropionato de etilo,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , reflujo, 18 h; (iii) ácido 4-aminobenzoico,  $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$  2.0 M en heptano, THF, 125 °C, 20 min.

Esquema 15. Síntesis de los derivados 1,5 diarilpirazoles aromáticos **36-40**.

Para ello, se hizo reaccionar el pirazol **47** junto con 3-aminofenol en presencia de trimetilaluminio obteniéndose el compuesto **36**. El derivado **37** se aisló tras la reacción de **47** y 4-aminofenol bajo las mismas condiciones de reacción. Por otro lado, la reacción del pirazol **47** con ácido 4-aminobenzoico en presencia de trimetilaluminio dio lugar al compuesto **40** con excelentes rendimientos.

Los derivados **38** y **39** se prepararon tras una reacción de sustitución nucleófila de los intermedios fenólicos correspondientes con 2-bromo-2-metilpropionato de etilo (Esquema 15).

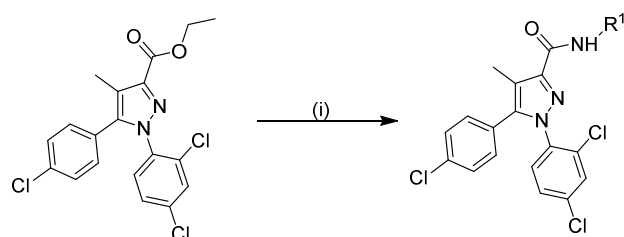
#### *Síntesis de derivados 1,5-diarilpirazoles alquílicos y alquílicos cíclicos (**41-46**)*

Estos nuevos derivados se caracterizan por incorporar el anillo del adamantano y el de ciclohexano diferentemente sustituidos en la posición R<sup>1</sup>. La presencia del anillo de adamantano en una gran variedad de moléculas biológicamente activas, lo convierte en una estructura privilegiada en química médica. Tras sintetizar los derivados de adamantano se decidió introducir el ciclohexano, manteniendo la posición de los grupos funcionales, con el fin de eliminar parte de la rigidez y el impedimento estérico que aportaba la estructura del adamantano. Ambas modificaciones proporcionaron un aumento de lipofilia en la molécula final.

Los derivados **41-43** se sintetizaron en un reactor de microondas. La reacción del pirazol **47** y los correspondientes aminoalcoholes en presencia del ácido de Lewis dio lugar a los derivados **41** y **43**. Para la obtención de los derivados **42a** y

**42b** fue necesaria la síntesis previa de la mezcla de isómeros *E*-(*Z*)-4-aminoadamantol, procedimiento descrito en el capítulo 3 de la presente tesis. Dicha mezcla de isómeros se hizo reaccionar con el compuesto **47** en presencia de trimetilaluminio.

Finalmente, para completar el estudio SAR se sintetizaron los derivados **44-46**. Se eliminó totalmente el impedimento estérico de los derivados cíclicos, manteniendo el número de metilenos entre los grupos funcionales. Para la síntesis de estos derivados se siguió la misma metodología. Para ello, se hizo reaccionar el compuesto **47** con las correspondientes aminas en presencia del ácido de Lewis (Esquema 16).



**41** R<sup>1</sup>= 3-aminoadamantol-1-il

**42a** R<sup>1</sup>= *Z*-4-hidroxiadamantan-1-il

**42b** R<sup>1</sup>= *E*-4-hidroxiadamantan-1-il

**43** R<sup>1</sup>= *trans* 4-hidroxiciclohexil

**44** R<sup>1</sup>= 3-hidroxipropil

**45** R<sup>1</sup>= 4-hidroxibutil

**43** R<sup>1</sup>= 3-metoxipropil

Reactivos y condiciones: (i) R<sup>1</sup>-NH<sub>2</sub>, Al(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 2.0 M en heptano, THF, 125 °C, 20 min.

Esquema 16. Síntesis de derivados **41-46**.

### 1.2.2.2. Estudios de “docking”

A pesar de que estas estructuras han sido diseñadas para interaccionar con dos dianas biológicas en una primera aproximación sólo se ha llevado a cabo el docking con los receptores PPAR. Esto se debe a nuestra experiencia en el primer tipo de receptores y a la abundancia de estructuras cristalinas de los mismos, mientras que, hasta la fecha, no se han cristalizado los receptores CBs y sólo se dispone de modelos por homología.

#### *“Docking” PPAR $\alpha$*

Como se observa en la Figura 29A, el compuesto **38** interacciona en el centro activo de LBD-PPAR $\alpha$ . Una de las conformaciones más favorables muestra la formación de enlaces de hidrógeno con el residuo Tyr-464, fundamental para la activación, y además se estabiliza con His-440. Estas interacciones ocurren a través del fibrato. Además del factor energético y de la formación del puente de hidrógeno con Tyr-464 parece que hay otro factor importante que es la flexibilidad del ligando. Observando la estructura cristalográfica se ve como adquiere una forma curvada exponiendo el carboxilato a los aminoácidos polares, lo que permite a los derivados de ácidos grasos amoldarse a esa forma curvada. El enlace amida presente en los compuestos les confiere una notable rigidez, impidiendo que las moléculas se curven para que toda la parte aromática se adecue al bolsillo y los grupos polares formen enlaces de hidrógeno con la Tyr-464. La posición meta del hidroxilo y el fibrato en el anillo aromático les

permite adoptar la forma C, y esto podría justificar la actividad biológica especialmente de los compuestos **36** y **38** (Figura 29B).

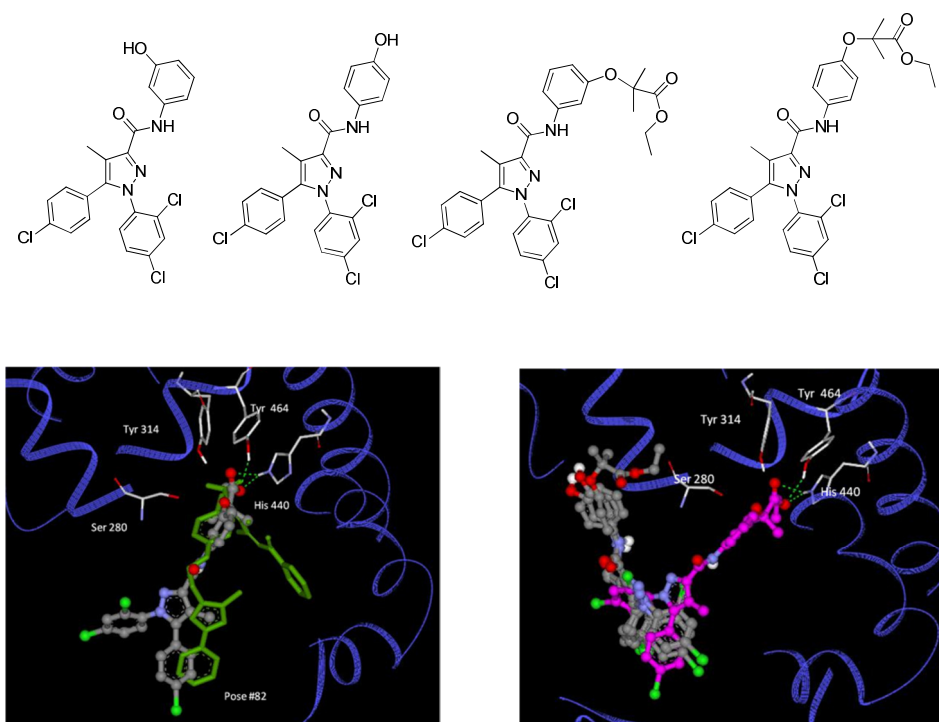


Figura 29. (A) Compuesto **38**-GW4095440 (verde). (B) Compuesto **36** (magenta), **37** y **39**.

Los datos de modelización correspondientes a los compuestos **41**, **42a** y **42b** indican que la presencia del anillo de adamantano aumenta la rigidez de la molécula e impide adoptar la disposición espacial necesaria para establecer los puentes de hidrógeno fundamentales, especialmente con la Tyr-464.

Como se observa en la Figura 30, los derivados alifáticos **44** y **45** recuperan parte de la flexibilidad molecular. En los resultados de su modelización se observa como las cadenas alquílicas facilitan que los anillos aromáticos se adecuen al bolsillo, permitiendo que el grupo polar interaccione con algunos de los residuos del LBD, como Ser -280.

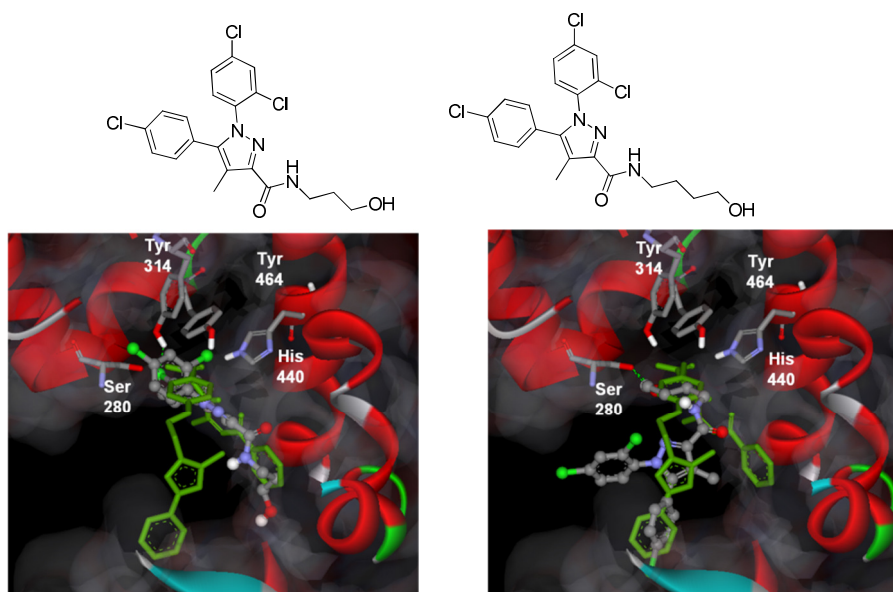
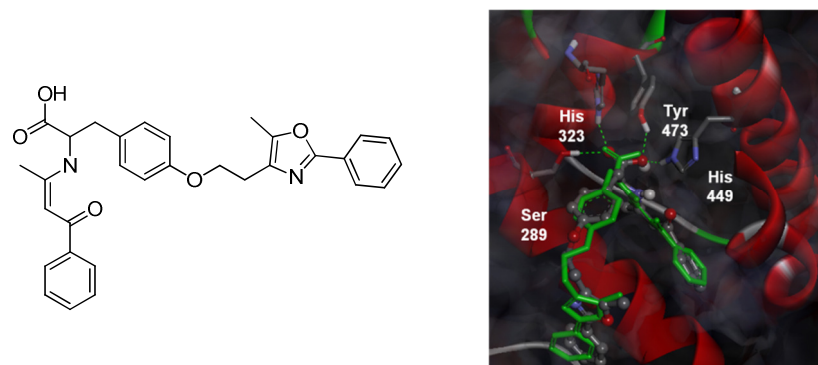


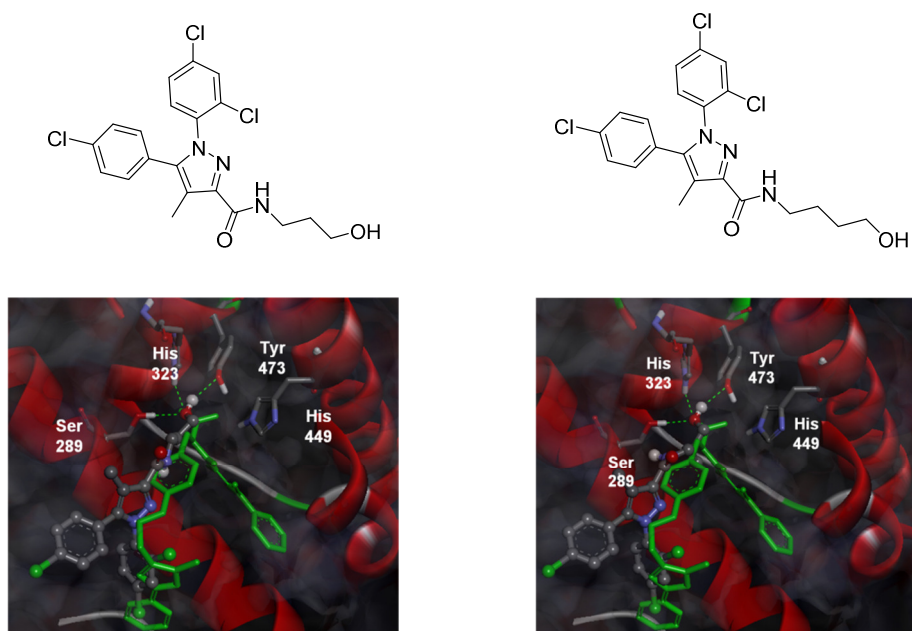
Figura 30. “Docking” compuesto **44** (izda.) y compuesto **45** (dcha).

#### *“Docking” PPAR $\gamma$ :*

Basándonos en los resultados anteriormente descritos se decidió estudiar los derivados **44** y **45** en el LBD-PPAR $\gamma$ . En este caso para validar el modelo se utiliza la estructura cristalina de GW409544 unido al LBD del PPAR $\gamma$  (Figura 31), obtenido del PDB (Protein Data Bank).

Figura 31. GW409544-LBD PPAR $\gamma$ .

Como se observa en la Figura 32, los derivados **44** y **45** adoptan la conformación necesaria para establecer interacciones con los residuos polares del LBD. Al igual que ocurría en el caso de PPAR $\alpha$  la cadena alquílica permite adoptar la disposición necesaria para que el OH de **44** y **45** forme puentes de hidrógeno con los residuos de Tyr-473, His-323 y Ser-289.

Figura 32. Compuesto **44**-GW409544 (izda) y Compuesto **45**-GW409544 (dcha).

### 1.2.2.3 Evaluación farmacológica

Debido a la naturaleza dual de los compuestos **36-46**, se han realizado distintos ensayos farmacológicos para determinar tanto la actividad en los receptores cannabinoides como PPAR.

Para evaluar la actividad en CB1 y CB2 se han realizado los siguientes ensayos biológicos *in vitro*:

- Ensayos de desplazamiento de radioligando.
- Ensayos de funcionalidad en tejido aislado.

La actividad de los compuestos en PPAR ha sido determinada por el ensayo *in vitro* de interacción proteína-ADN: transfección celular y ensayo del gen indicador de luciferasa (Reporter Gene Assay), ya comentado.

#### *Ensayos de desplazamiento de radioligando.*

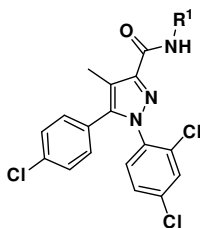
Estos ensayos se han realizado en el Departamento de Bioquímica de la UCM y en ellos se determina la afinidad de los compuestos por los receptores CB1 y CB2. La evaluación se realiza en membranas con células transfectadas de receptores humanos CB1 y CB2. La interacción con los receptores se determina en función del porcentaje de desplazamiento del radioligando cannabinoide [<sup>3</sup>H]-CP55940 en dichas membranas.



*Ensayos de funcionalidad en tejido aislado.*

Este tipo de pruebas permiten simplificar los estudios *in vivo* al eliminarse los factores de distribución, metabolismo y excreción; y establecer las propiedades agonistas o antagonistas de posibles ligandos cannabinoides. Así pues, se han llevado a cabo en colaboración con el Departamento de Farmacología y Nutrición de la URJC estudios de inhibición dosis-dependiente del efecto contráctil producido por la estimulación eléctrica en conducto deferente de ratón. Los compuestos con naturaleza agonista cannabinoide CB1 tienen la capacidad de inhibir las contracciones inducidas eléctricamente. Los compuestos con actividad antagonista son capaces de bloquear este efecto inhibitorio, mientras que los agonistas inversos producen un aumento de la contracción.

Como se observa en la Tabla 5, los compuestos **36-46** producen el desplazamiento de radioligando en ambas membranas, presentando algunos derivados una alta afinidad por ambos receptores. En el caso del compuesto **38** no se produjo desplazamiento significativo de radioligando en las membranas CB2, por lo que podría considerarse un ligando selectivo CB1. Los compuestos **36-46** presentan una constante de afinidad en el rango nM por ambos receptores. En concreto, los derivados **38**, **41** y **42a** muestran una constante de afinidad mayor por el receptor CB1 que el compuesto de referencia WIN-55,212-2.



Compuesto	R <sup>1</sup>	K <sub>i</sub> CB1 (nM)	K <sub>i</sub> CB2 (nM)
<b>Rimonabant</b>		7.3 ± 0.97	-
<b>WIN-55,212-2</b>		45.6 ± 8.6	3.73 ± 0.20
<b>36</b>	3-hidroxifenil	52 ± 22	-
<b>37</b>	4-hidroxifenil	4.6 ± 0.96	109.8 ± 50.9
<b>38</b>	3-fenoxi-2-metilpropanoato	65 ± 17	-
<b>39</b>	4-fenoxi-2-metilpropanoato	109 ± 50	809.8 ± 132.5
<b>40</b>		1341 ± 185	3693 ± 1093
<b>41</b>	3-aminoadaman-1-il	21.13 ± 13.29	20 ± 4
<b>42a</b>	Z-4-hidroxiadamantan-1-il	18.96 ± 4.80	52 ± 12
<b>43</b>	4-hidroxiciclohexil	628 ± 150	1622 ± 315
<b>44</b>	3-hidroxipropil <sup>a</sup>	156	1250 ± 280
<b>45</b>	4-hidroxibutil <sup>a</sup>	155	5720
<b>46</b>	3-metoxipropil	553 ± 235	1795 ± 468

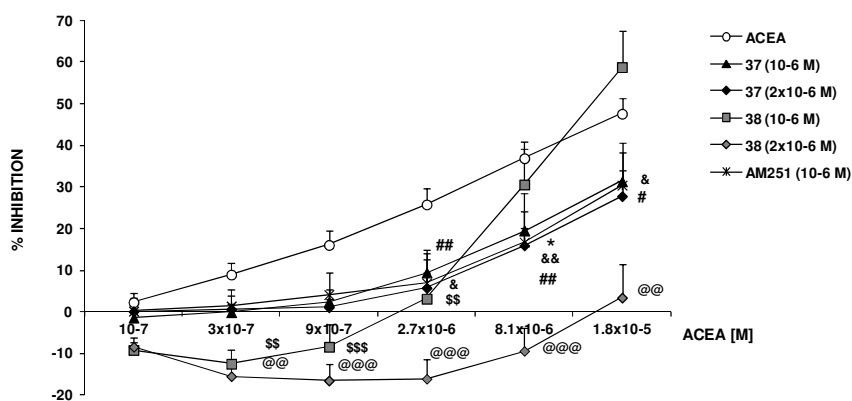
(-) = no determinado. <sup>a</sup> Valor publicado en Francisco MEY et al., J Med Chem 45:2708, 2002.

Tabla 5. Valores de K<sub>i</sub> CB1 y CB2 de los compuestos **36-46**.

Para los ensayos de funcionalidad cannabinoide se utilizan como ligandos de referencia araquidonil-2-cloroetilamida (ACEA) y AM251, como ligandos agonistas y antagonistas CB1 respectivamente. Se llevan a cabo los ensayos de

funcionalidad de los derivados **37** y **38**, los cuales muestran muy buena actividad cannabinoide y son estructuralmente novedosos.

Como se observa en las curvas concentración–respuesta (Figura 33), los ensayos realizados en presencia de los derivados **37** y **38** demuestran una disminución significativa de la capacidad inhibitoria mostrada por el ligando ACEA agonista. El compuesto **37** produce mayor efecto que el ligando de referencia AM251, mientras que el compuesto **38** presenta una actividad comparable a la de AM251. Así pues, se puede concluir que tanto **37** como **38** se comportan como antagonistas cannabinoides.



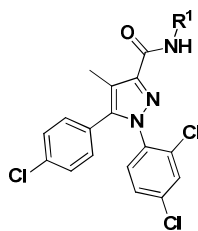
Efecto inhibitorio sobre la respuesta contráctil del compuesto **37** y **38** como media %  $\pm$  e.e.m (n=6-8). \* $p<0.05$ : compuesto **37** ( $10^{-6}$  M) + ACEA vs. ACEA; # $p<0.05$ , ## $p<0.01$ : compuesto **38** ( $2 \times 10^{-6}$  M) + ACEA vs. ACEA; \$\$ $p<0.01$ , \$\$\$ $p<0.001$ : compuesto **3** ( $10^{-6}$  M) + ACEA vs. ACEA; @@ $p<0.01$ , @@@ $p<0.001$ : compuesto **3** ( $2 \times 10^{-6}$  M) + ACEA vs. ACEA; & $p<0.05$ , && $p<0.01$ : AM251 ( $10^{-6}$  M) + ACEA vs. ACEA.

Figura 33. Ensayos en conducto deferente de ratón de los compuestos **37** y **38**.

*Ensayo in vitro de interacción proteína-ADN: Transfección celular y ensayo del gen indicador de luciferasa (Reporter Gene Assay).*

La metodología llevada a cabo en estos ensayos es similar a la descrita en el parte experimental del capítulo.

La mayoría de los derivados 1,5-diarilpirazoles sintetizados muestran actividad PPAR $\alpha$  (Tabla 6). En cuanto a los derivados con el resto R<sup>1</sup> aromático, **36–39**, inducen actividad luciferasa mostrando una EC<sub>50</sub> en el rango nanomolar comparable a la del ligando de referencia WY14643. El derivado **40** tiene una actividad agonista de un orden de magnitud menor respecto al resto de derivados aromáticos, posiblemente la ausencia de un espaciador entre el anillo aromático y el ácido carboxílico provoca la pérdida de parte de la actividad biológica. Por otro lado, los derivados alquílicos presentan actividades muy diferentes dependiendo de su naturaleza cíclica o no cíclica. Como se observa en la Tabla 6, son los derivados de cadena alquílica, **44** y **46**, los que muestran actividad agonista por PPAR $\alpha$  en el rango nanomolar.



Compuesto	R <sup>1</sup>	K <sub>i</sub> CB1 (nM)	K <sub>i</sub> CB2 (nM)	PPARα EC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>
Rimonabant		7.3 ± 0.97		-
WIN-55,212-2		45.6 ± 8.6	3.73 ± 0.20	-
OEA				152 ± 31
WY14643				650 ± 134
36	3-hidroxifenil	52 ± 22	-	887 ± 185
37	4-hidroxifenil	4.6 ± 0.96	109.8 ± 50.9	856 ± 166
38	3-fenoxi-2- metilpropanoato	65 ± 17	-	971 ± 180
39	4-fenoxi-2- metilpropanoato	109 ± 50	809.8 ± 132.5	1480 ± 253
40		1341 ± 185	3693 ± 1093	3245 ± 932
41	3-aminoadaman-1-il	21.13 ± 13.29	20 ± 4	2219 ± 334
42a	Z-4-hidroxiadamantan-1-il	18.96 ± 4.80	52 ± 12	1896 ± 408
43	4-hidroxiciclohexil	628 ± 150	1622 ± 315	1356 ± 425
44	3-hidroxipropil	156	1250 ± 280	675 ± 102
45	4-hidroxibutil	155	5720	834 ± 123
46	3-metoxipropil	553 ± 235	1795 ± 468	840 ± 210

Tabla 6. Valores de EC<sub>50</sub> PPARα de los compuestos **36-46**.

Finalmente, en función de los resultados obtenidos del “docking” con PPAR $\gamma$  se seleccionaron los compuestos **44** y **45** para llevar a cabo los ensayos en PPAR $\gamma$ . Como se observa en la Tabla 7, ambos inducen una actividad luciferasa obteniéndose una EC<sub>50</sub> en el rango nanomolar, lo que indica que tienen buena afinidad por el receptor, incluso superior a la mostrada por el fármaco de referencia rosiglitazona.

COMPUESTO	R <sup>1</sup>	PPAR $\alpha$ EC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>
ROSIGLITAZONA		870±11
<b>44</b>	3-hidroxipropil	543 ± 87
<b>45</b>	4-hidroxibutil	465 ± 56

Tabla 7. Valores de EC<sub>50</sub> PPAR $\gamma$  de los compuestos **44** y **45**.

### 1.3 CONCLUSIONES

- Se ha sintetizado una nueva familia de compuestos con el resto (*R*)-3-((4-bencil-2-oxooxazolidin-3-il)metil que ha sido identificado por estudios de "docking" como fundamental para la transcripción de PPAR $\alpha$ . (P201331058-2013).
- Los ensayos biológicos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que tanto **2** como **4** pueden ser considerados ligandos agonistas PPAR $\alpha$  con afinidad en el rango nanomolar *in vitro* y con resultados prometedores en la disminución de ingesta de comida.
- La dualidad de estos compuestos demostrando actividad además por PPAR $\gamma$ , les convierte en interesantes cabezas de serie para el desarrollo de nuevos ligandos para el tratamiento de las diferentes alteraciones metabólicas.
- La elaidilsulfamida **9** ilustra bien la dificultad que supone buscar agentes para el tratamiento del síndrome metabólico de etiología multifactorial, ya que aunque ES presenta propiedades anorexígenas importantes incide también de manera negativa en la resistencia a insulina.
- Se describe por primera vez una nueva familia de ligandos duales PPAR/CB algunos de los cuales presentan afinidad nanomolar por ambos tipos de receptores. Se comportan como agonistas PPAR $\alpha$  y antagonistas cannabinoides siendo el compuesto **38** selectivo frente a CB1.

- Los estudios teóricos de docking han identificado los residuos y las interacciones involucradas en la activación transcripcional de PPAR $\alpha$  y han demostrado la importancia de los grupos funcionales aceptores de hidrógeno que permiten establecer interacciones con los residuos polares importantes del LBD - PPAR $\alpha$ .



### 1.3. PARTE EXPERIMENTAL QUÍMICA

Las reacciones se siguieron por cromatografía en capa fina utilizando placas de gel de sílice Merck tipo 60 F254. Las placas se revelaron con luz ultravioleta (254 nm). Los crudos de reacción se purificaron por cromatografía en columna, utilizando como fase estacionaria gel de sílice Merck tipo 60 (230-400 mesh ASTM). Los puntos de fusión se midieron en el equipo Mettler Toledo MP70. Los análisis de LC-MS se llevaron a cabo en un Alliance 2695 (Waters) con un detector de UV Photodiode Array modelo Waters 2996 acoplado a un detector de MS modelo Micromass ZQ de Waters. La cromatografía se realizó en fase reversa una columna X-bridge C18-3.5  $\mu\text{m}$  (Waters) de dimensiones 2.1 mm x 100 mm. Se utilizó como fase móvil A:  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0.08% v/v Ac. Fórmico y B:  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.1% v/v Ac. Fórmico. El gradiente general utilizado fue de 15% a 95% de  $\text{CH}_3\text{CN}$ , en 10 min, con un volumen de inyección de 3  $\mu\text{L}$ , un flujo de 0.25 mL/min y, los análisis fueron monitorizados a  $\lambda = 254$  nm. En los casos en los que fue utilizado un gradiente diferente fue indicado en la parte experimental. La detección de masas se realizó mediante el equipo Micromass ZQ acoplado al módulo de HPLC utilizando tres voltajes de cono diferentes (20, 40, 60V) y detección por ESI-MS positiva. Se utilizó el reactor de microondas Initiator<sup>TM</sup> de Biotage<sup>®</sup>. Los análisis elementales se han realizado en el laboratorio de microanálisis del centro de Química Orgánica “Lora Tamayo”, con un analizador Heraeus CHNO Rapid. Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN se registraron en un espectrómetro Bruker AVANCE-300, operando a 300,13 MHz y 75,47 MHz respectivamente. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm ( $\delta$ ). La

multiplicidad de las señales (s: singlete, d: doblete, t: triplete, c: cuádruplete, m: multiplete) y las constantes de acoplamiento  $J$  (Hz).

### **Estudios teóricos de “docking” molecular:**

*Calculos teóricos.* Todos los cálculos necesarios fueron realizados en una estación de trabajo Intel® Core™2 Quad Linux Ubuntu kernel 3.4.0.

*Preparación de las estructuras de los ligandos y la proteína diana.* La conformación tridimensional inicial de cada uno de los ligandos se construyó mediante el paquete informático Marvin 5.4.1 (2013), ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>, accedido 09/10/2012), y luego fue optimizada para el cálculo de las cargas parciales a nivel cuántico PM6 utilizando el software MOPAC 2012.<sup>67</sup> La preparación de los ligandos para el estudio de docking se realizó a través del paquete informático AutoDockTools versión 1.5 (ADT) (The Scripps Research Institute: <http://mgltools.scripps.edu/> Accedido 06/02/2013) mediante el cual se definieron los enlaces rotables y el tratamiento de forma implícita de los átomos de hidrógeno unidos a átomos apolares.

La estructura tridimensional de las macromoléculas diana se obtuvieron de la base de datos RCSB Protein Data Bank.<sup>68</sup> Se utilizó la estructura de los Dominios de Unión a Ligando del PPAR $\alpha$  (cadena A del archivo de estructura código PDB: 1K7L) y PPAR $\gamma$  (cadena D del archivo de estructura código PDB:

---

<sup>67</sup> Dutra, J. D. L.; Filho, M. A.; Rocha, G. B.; Freire, R. O.; Simas, A. M.; Stewart, J. J. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2013**.

<sup>68</sup> Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*, 235.

1K74) unidos al agonista sintético GW409544.<sup>69</sup> Los ligandos co-cristalizados, las moléculas de sales y las moléculas de agua fueron eliminadas y, por último, se chequearon las formas tautoméricas. Con el objeto de optimizar la red de enlaces de hidrógeno, se utilizó el servidor Mol Probitry para el cálculo y adición de los átomos de hidrógeno.<sup>70</sup> Finalmente, se asignaron cargas parciales Kollman a través del software ADT.

*Protocolo de Docking.* Los experimentos teóricos se llevaron a cabo por medio del paquete informático Autodock 4.2. Para los cálculos, se construyeron celdas de maya en el sitio de unión del ligando co-cristalizado GW409544 de dimensiones de los ejes de 60x60x60 puntos y un espaciado de puntos de cálculo de 0.375 Å, para PPAR $\alpha$  se centró en las coordenadas X= -17.866; Y= -13.599; Z= -3.726, y para PPAR $\gamma$  en X=12.767, Y=18.316, Z=9.130. Se empleó el algoritmo genético lamarckiano para generar el conjunto de 100 soluciones finales, el número máximo de generaciones fue de 27.000 y el de evaluaciones energéticas de 25.000.000. El resto de parámetros se mantuvo en sus valores por defecto.

*Análisis del modo de unión.* Para seleccionar el modo de unión representativo de cada compuesto, se aplicó un método de análisis cualitativo<sup>71</sup> basado en: a) los parámetros energéticos (valores de energía de interacción favorable), b) datos

---

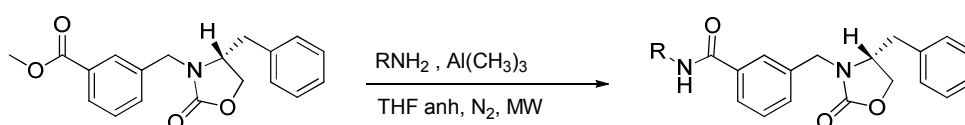
<sup>69</sup> Xu, H. E.; Lambert, M. H.; Montana, V. G.; Plunket, K. D.; Moore, L. B.; Collins, J. L.; Oplinger, J. A.; Kliwer, S. A.; Gampe, R. T.; McKee, D. D. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98*, 13919.

<sup>70</sup> Davis, I. W.; Leaver-Fay, A.; Chen, V. B.; Block, J. N.; Kapral, G. J.; Wang, X.; Murray, L. W.; Arendall, W. B.; Snoeyink, J.; Richardson, J. S. *Nucleic Acids Research* **2007**, *35*, W375.

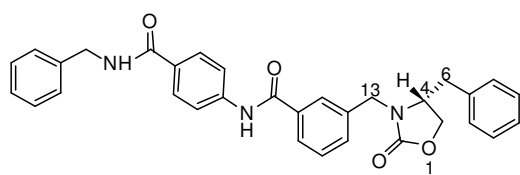
<sup>71</sup> Ali, H. I.; Tomita, K.; Akaho, E.; Kunishima, M.; Kawashima, Y.; Yamagishi, T.; Ikeya, H.; Nagamatsu, T. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *43*, 1376.

de localización (mejor encaje con la estructura del ligando co-cristalizado GW409544) y c) orientación de grupos funcionales hacia zonas clave para la actividad del receptor (formación del enlace de hidrógeno con el grupo hidroxilo de las cadenas laterales de los residuos Tyr-464 de PPAR $\alpha$  y Tyr-473 de PPAR $\gamma$ ). Los enlaces de hidrógeno y las propiedades de interacción de los ligando con el receptor se evaluaron mediante el software Accelrys Discovery Studio® version 3.5 (Accelrys, Inc., San Diego, CA, USA).

### PROCEDIMIENTO GENERAL



### Síntesis de (*R*)-3-[(4-bencil-2-oxooxazolidin-3-il)metil]-*N*-[4-(bencilcarbamoil)fenil]benzamida (**1**)

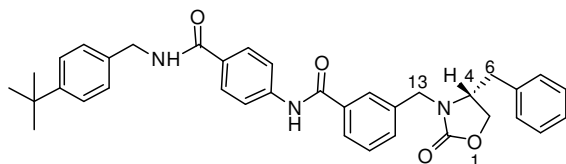


A una disolución de **22** (0.06 g, 0.18 mmol) y del compuesto **16** (0.081 g, 0.36 mmol) en THF anhidro (10 mL), bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, se añade Al(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> en heptano 2.0 M (0.2 mL, 0.36 mmol). La mezcla de reacción se calienta a 125 °C durante 35 min en un reactor microondas. El crudo de reacción se enfría en una mezcla hielo-H<sub>2</sub>O y se adiciona gota a gota HCl 1 N hasta el cese de efervescencia. A continuación, se extrae con dietiléter (2x20 mL), el extracto

orgánico se seca sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage ( $\text{AcOEt}$ /hexano desde 5:95 hasta 10:90) obteniéndose el compuesto **1** como un sólido blanco (0.04 g, 40 %). P.f. 120 °C.

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 10.47 (s, 1H, NH), 8.95 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 8.04 – 7.78 (m, 6H, H-Ar), 7.64 – 7.48 (m, 4H, H-Ar), 7.45 – 7.13 (m, 8H, H-Ar), 4.68 (m, 1H), 4.47 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 4.41-4.31 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 4.08 – 3.99 (m, 1H), 4.03 – 3.83 (m, 1H, H-4), 3.05 (dd,  $J_{ab} = 13.5$ ,  $J_{a4} = 4.2$  Hz, 1H, H-6<sub>a</sub>), 2.75 (dd,  $J_{ba} = 13.5$ ,  $J_{b4} = 8.2$  Hz, 1H, H-6<sub>b</sub>).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 165.6 (CO), 165.5 (CO), 158.6 (C-2), 139.8, 137.3, 136.1, 135.1, 135.5, 131.0, 129.2 (2C), 128.7, 128.5 (2C), 128.2 (3C), 127.9 (2C), 127.2 (3C), 126.8, 126.7 (2C), 119.5 (2C), 66.3 (C-5), 55.3 (C-4), 45.1 (C-13), 42.5 ( $\text{CH}_2$ ), 37.2 (C-6). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  40-95 % en 10.0 min,  $t_r = 4.61$  min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 520$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{32}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4$ : C, 73.97; H, 5.63; N, 8.09. Experimental C, 73.88; H, 5.66; N, 8.08.

**Síntesis de (*R*)-3-[(4-bencil-2-oxooxazolidin-3-il)metil]-*N*-[4-((4-*tert*-butil)bencil)carbamoil)fenil]benzamida (**2**)**

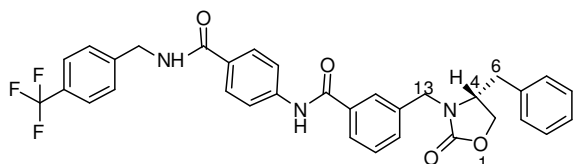


A una disolución de **22** (0.06 g, 0.18 mmol) y del compuesto **17** (0.10 g, 0.36 mmol) bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  se

añade  $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$  en heptano 2.0 M (0.2 mL, 0.36 mmol). La mezcla de reacción se

calienta a 125 °C durante 35 min en un reactor microondas. El crudo de reacción se enfría en una mezcla hielo-H<sub>2</sub>O y se acidifica con HCl 1 N hasta el cese de efervescencia. A continuación, se extrae con dietiléter (2x20 mL) los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (AcOEt/hexano desde 5:95 hasta 10:90) obteniéndose el compuesto **2** como un sólido blanco (0.05 g, 44 %). P.f. 110 °C. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.91 (s, 1H, NH), 7.83-7.80 (m, 1H, H-Ar), 7.78 – 7.63 (m, 5H, H-Ar), 7.44 – 7.15 (m, 9H, H-Ar), 7.07 – 6.96 (m, 2H, H-Ar), 6.66 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 4.74 - 4.65 (m, 1H), 4.57 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 4.21 – 4.07 (m, 2H), 4.00 – 3.90 (m, 1H), 3.87 – 3.76 (m, 1H, H-4), 3.04 (dd, *J*<sub>ab</sub> = 13.6, *J*<sub>a4</sub> = 4.8 Hz, 1H, H-6<sub>a</sub>), 2.63 (dd, *J*<sub>ba</sub> = 13.6, *J*<sub>b4</sub> = 8.5 Hz, 1H, H-6<sub>b</sub>), 1.30 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 166.8 (CO), 165.8 (CO), 158.6 (C-2), 150.5, 141.2 (C-7), 139.7, 136.5, 135.2, 131.2, 129.8, 129.2, 128.9 (2C), 128.9 (2C), 127.9 (2C), 127.7 (2C), 127.2, 127.1, 126.6, 125.6 (2C), 119.9 (2C), 67.1 (C-5), 55.8 (C-4), 46.0 (C-13), 43.8 (CH<sub>2</sub>), 38.6 (C-6), 34.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.3 (3CH<sub>3</sub>). Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 15-95 % en 10.0 min, *t*<sub>r</sub> = 8.83 min, *m/z* [M+H]<sup>+</sup> = 576. Análisis elemental teórico C<sub>36</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 75.11; H, 6.48; N, 7.30; experimental C, 75.00; H, 6.75; N, 7.70.

**Síntesis de 3-[(4-bencil-2-oxooxazolidin-3-il)metil]-N-[4-((4-(trifluorometil)bencil)carbamoil)fenil]benzamida (3)**

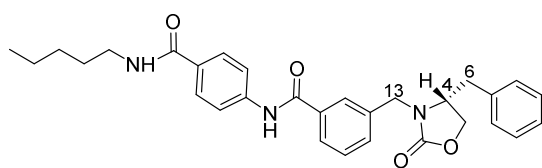


A una disolución de **22** (0.1 g, 0.31 mmol) y el compuesto **18** (0.18 g, 0.61 mmol) bajo atmósfera de N<sub>2</sub> se

añade Al(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> en heptano 2.0 M (0.3 mL, 0.61 mmol), y la mezcla de reacción se calienta a 125 °C durante 35 min en un reactor microondas. El crudo de reacción se enfría en una mezcla hielo-H<sub>2</sub>O y se acidifica con HCl (1 N) hasta el cese de efervescencia. A continuación, se extrae con dietiléter (2x30 mL), los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> desde 0:100 hasta 10:90) obteniéndose el compuesto **3** como un sólido blanco (0.09 g, 50 %). P.f. 114 °C. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 10.49 (s, 1H, NH), 9.07 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>NH), 7.98 – 7.77 (m, 6H, H-Ar), 7.69 (m, 2H, H-Ar), 7.53 (m, 5H, H-Ar), 7.35 – 7.10 (m, 4H, H-Ar), 4.68 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 4.55 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 4.41 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.92 (m, 1H, H-4), 3.05 (dd, *J*<sub>ab</sub> = 13.5, *J*<sub>a4</sub> = 4.2 Hz, 1H, H-6), 2.75 (dd, *J*<sub>ba</sub> = 13.6, *J*<sub>b4</sub> = 8.1 Hz, 1H, H-6). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO) δ (ppm) 165.8 (CO), 165.7 (CO), 157.7 (C-2), 144.7, 141.9, 139.2, 137.3, 136.1, 135.1, 131.0, 129.2 (2C), 129.0, 128.7, 128.5 (3C), 128.0 (2C), 127.9 (3C), 127.85, 127.6, 126.8, 126.7, 125.2, 119.5, 66.3 (C-5), 55.3 (C-4), 45.1 (C-13), 42.3 (NHCH<sub>2</sub>), 37.2 (C-6). Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O

15-95 % en 10.0 min,  $t_r = 10.2$  min,  $m/z$   $[M+H]^+ = 588$ . Análisis elemental teórico  $C_{33}H_{28}F_3N_3O_4$ : C, 67.45; H, 4.80; N, 7.15; experimental C, 67.69; H, 5.00; N, 7.14.

**Síntesis de (*R*)-3-[(4-bencil-2-oxooxazolidin-3-il)metil]-*N*-[4-(pentilcarbamoil)fenil]benzamida (**4**)**



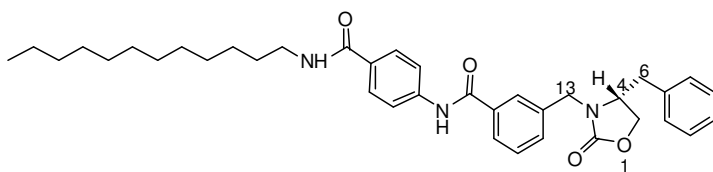
A una disolución de **22** (0.10 g, 0.31 mmol) y el compuesto **19** (0.13 g, 0.61 mmol) bajo atmósfera de  $N_2$  se

añade  $Al(CH_3)_3$  en heptano 2.0 M (0.31 mL, 0.61 mmol), y la mezcla de reacción se calienta a 125 °C durante 35 min en un reactor microondas. El crudo de reacción se enfría en una mezcla hielo- $H_2O$  y se acidifica con HCl (1 N), hasta el cese de efervescencia. A continuación, se extrae con dietiléter (2x20 mL), los extractos orgánicos se secan sobre  $MgSO_4$  anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (AcOEt/hexano desde 5:95 hasta 10:90) obteniéndose el compuesto **4** como un sólido blanco (0.07 g, 45 %). P.f. 140 °C.  $^1H$  RMN (300 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 10.46 (s, 1H, NH), 8.35 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H,  $CH_2NH$ ), 7.91 (m, 1H, H-Ar), 7.86 (sa, 5H-Ar), 7.58 – 7.51 (m, 2H, H-Ar), 7.32 – 7.17 (m, 5H, H-Ar), 4.69 (m, 1H), 4.42 (m, 1H), 4.23 (m, 1H), 4.06 (m, 1H), 4.00 – 3.89 (m, 1H, H-4), 3.25 (m, 2H,  $NHCH_2$ ), 3.06 (dd,  $J_{ab} = 13.6$ ,  $J_{a4} = 4.2$  Hz, 1H, H-6<sub>a</sub>), 2.77 (dd,  $J_{ba} = 13.6$ ,  $J_{b4} = 8.1$  Hz, 1H, H-6<sub>b</sub>), 1.52 (m, 2H), 1.42 – 1.18 (m, 4H), 0.85 (m,  $J = 6.8$  Hz, 3H,  $CH_3$ ).  $^{13}C$  RMN (75 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm)



166.0 (CO), 165.9 (CO), 158.1 (C-2), 141.9, 137.6, 136.5, 135.5, 131.4, 130.1, 129.6 (2C), 129.1, 128.9 (2C), 128.2 (2C), 127.6, 127.2, 127.1, 119.8 (2C), 66.7 (C-5), 55.7 (C-4), 45.5 (C-13), 40.7 (CH<sub>2</sub>), 37.6 (C-6), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 22.3 (CH<sub>2</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>). Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 40-95 % en 10.0 min, tr= 5.09 min, m/z [M+H]<sup>+</sup>= 500. Análisis elemental teórico C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 72.12; H, 6.66; N, 8.41; experimental C, 72.40; H, 6.83; N, 8.68.

**Síntesis de (R)-3-[(4-bencil-2-oxooxazolidin-3-il)metil]-N-[4-(dodecilcarbamoil)fenil]benzamida (5)**

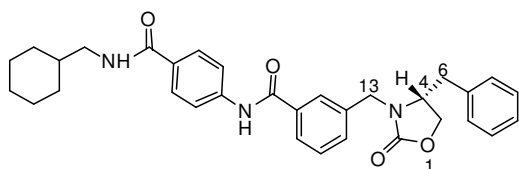


A una disolución de **22** (0.06 g, 0.18 mmol) y el compuesto **20** (0.11 g,

0.36 mmol) bajo atmósfera de N<sub>2</sub> se añade Al(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> en heptano 2.0 M (0.18 mL, 0.36 mmol), y la mezcla de reacción se calienta a 125 °C durante 35 min en un reactor microondas. El crudo de reacción se enfría en una mezcla hielo-H<sub>2</sub>O y se acidifica con HCl (1 N). A continuación, se extrae con dietiléter (2x20 mL), los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (AcOEt/hexano desde 5:95 hasta 10:90) obteniéndose el compuesto **5** como un sólido blanco (0.05 g, 45 %). P.f . 115 °C. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.69 – 8.56 (m, 1H, NH), 7.94 – 7.64 (m, 5H, H-Ar), 7.53 – 7.19 (m, 4H, H-Ar), 7.13 – 7.00 (m, 3H, H-Ar), 6.34 – 6.14

(m, 1H, H-Ar), 4.81 (m, 1H), 4.30 – 4.13 (m, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.94 – 3.79 (m, 1H), 3.45 - 3.30 (m, 1H, H-4), 3.06 (dd,  $J_{ab}$  = 13.6,  $J_{a4}$  = 4.8 Hz, 1H, H-6<sub>a</sub>), 2.66 (dd,  $J_{ba}$  = 13.6,  $J_{b4}$  = 8.6 Hz, 1H, H-6<sub>b</sub>), 1.60 – 1.55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.46 – 1.15 (m, 18H, 9CH<sub>2</sub>), 0.87 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 166.9 (CO), 165.6 (CO), 158.6 (C-2), 140.7, 139.7, 136.7, 135.4, 135.3, 131.4, 130.5, 129.3, 129.0 (2C), 127.8 (2C), 127.3, 127.0, 126.6, 119.9 (2C), 116.7, 67.2 (C-5), 55.7 (C-4), 46.1 (C-13), 40.2 (CH<sub>2</sub>), 38.7 (C-6), 31.9 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (4CH<sub>2</sub>), 29.3 (3CH<sub>2</sub>), 27.0 (CH<sub>2</sub>), 22.7 (CH<sub>2</sub>), 14.1 (CH<sub>3</sub>). Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 40-95 % en 10 min, tr = 9.93 min, m/z [M+H]<sup>+</sup> = 599. Análisis elemental teórico C<sub>37</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 74.34; H, 7.93; N, 7.03; experimental C, 74.20; H, 7.50; N, 7.04.

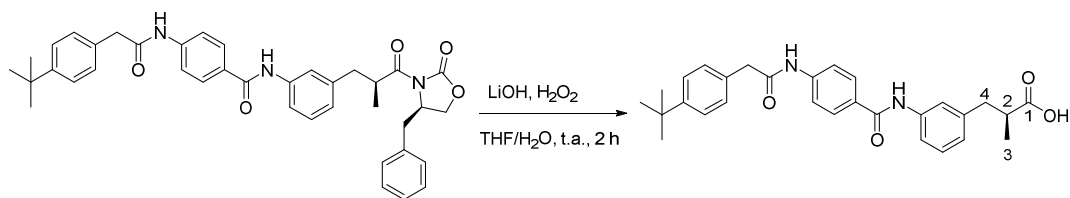
**Síntesis de (*R*)-3-[(4-bencil-2-oxooxazolidin-3-il)metil]-*N*-[4-((ciclohexilmetil)carbamoil)fenil]benzamida (6)**



A una disolución de **22** (0.06 g, 0.18 mmol) y el compuesto **21** (0.08 g, 0.36 mmol) bajo atmósfera de N<sub>2</sub> se añade Al(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> en heptano 2.0 M (0.18 mL, 0.36 mmol), y la mezcla de reacción se calienta a 125 °C durante 35 min en un reactor microondas. El crudo de reacción se enfría en una mezcla hielo-H<sub>2</sub>O y se acidifica con HCl (1 N) hasta el cese de efervescencia. A continuación, se extrae con dietiléter (2x20 mL), los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por

por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (AcOEt/hexano desde 5:95 hasta 10:90) obteniéndose el compuesto **6** como un sólido blanco (0.04 g, 42 %). P.f. 130 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 9.08 (s, 1H, NH), 7.85 (m, 1H, H-Ar), 7.78 – 7.61 (m, 5H, H-Ar), 7.45 – 7.16 (m, 5H, H-Ar), 7.09 – 6.96 (m, 2H, H-Ar), 6.50 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 4.73 (m, 1H), 4.21 – 4.06 (m, 2H), 4.00 (m, 1H), 3.93 – 3.79 (m, 1H, H-4), 3.25 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 3.03 (dd,  $J_{ab} = 13.6$ ,  $J_{a4} = 4.9$  Hz, 1H, H-6<sub>a</sub>), 2.63 (dd,  $J_{ba} = 13.6$ ,  $J_{b4} = 8.6$  Hz, 1H, H-6<sub>b</sub>), 1.82 – 1.52 (m, 6H), 1.32 – 1.10 (m, 4H), 0.93 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 166.9 (CO), 165.5 (CO), 158.5 (C-2), 140.8, 136.8, 135.4, 135.3, 131.4, 130.5, 129.3, 129.0, 127.9 (3C), 127.3 (2C), 127.0, 126.6, 119.8, 119.7 (2C), 67.2 (C-5), 55.7 (C-4), 46.3 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 46.1, 38.8 (C-6), 38.0 (CH), 30.9 (2CH<sub>2</sub>), 26.4 (CH<sub>2</sub>), 25.8 (2CH<sub>2</sub>). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  40-95 % en 10.0 min,  $t_r = 5.71$  min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 527$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_4$ : C, 73.12; H, 6.71; N, 7.99; experimental C, 73.44; H, 6.58; N, 7.52.

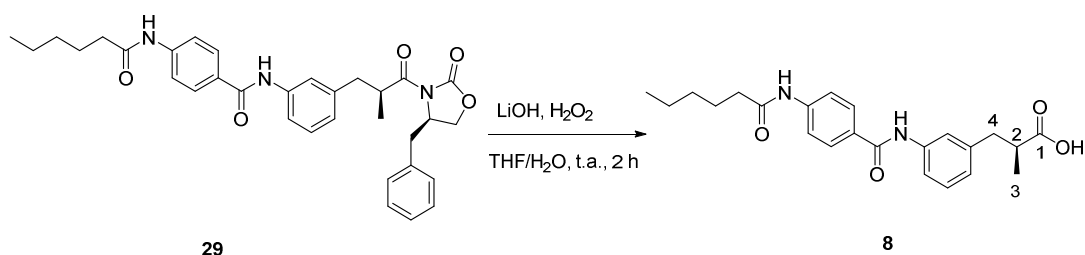
**Síntesis de ácido (S)-3-[3-(4-(2-(4-(*tert*-butil)fenil)acetamido)benzamido)fenil]-2-metilpropanoico (7)**



A una disolución<sup>28</sup> de **28** (0.14 g, 0.22 mmol) en  $\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$  (3:1) (30 mL) a 0 °C se adiciona una disolución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % (0.1 mL, 0.88 mmol), seguidamente se

adiciona una disolución de LiOH en H<sub>2</sub>O (0.01 g, 0.44 mmol) y la mezcla de reacción se agita durante 2 h a t.a. A continuación, se acidifica con HCl 1 N (1 mL), se extrae con AcOEt (2x20 mL) y los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida y el crudo de reacción se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (EtOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> desde 0:100 hasta 6:94), obteniéndose **7** como un sólido blanco (0.07 g, 70 %). P.f 181 °C.  $[\alpha]_D^{20} = 11.1$ . <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 12.16 (s, 1H, COOH), 10.40 (s, 1H, NH), 10.04 (s, 1H, NH), 7.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-2',6'), 7.72 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-3',5'), 7.64 – 7.57 (m, 2H, H-Ar), 7.34 (m, 2H, H-Ar), 7.26 (m, 3H, H-Ar), 6.91 (m, 1H, H-Ar), 3.62 (s, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 2.89 (m, 1H, H-4<sub>a</sub>), 2.66 – 2.54 (m, 2H, H-4<sub>b</sub>, H-2), 1.26 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>), 1.05 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 176.7 (CO), 169.7 (CO), 164.7 (CO), 148.9, 142.1, 139.9, 139.1, 132.6, 130.3, 129.1, 128.8 (2C), 128.5 (2C), 128.3, 125.1 (2C), 123.9, 120.8, 118.2 (2C), 42.9 (CH<sub>2</sub>CO), 40.6 (C-4), 38.7 (C-2), 34.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.1 (3CH<sub>3</sub>), 16.7 (CH<sub>3</sub>). Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 30-95 % en 10.0 min, tr= 6.72 min, m/z [M+H]<sup>+</sup>= 473. Análisis elemental teórico C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C, 73.7; H, 6.83; N, 5.93; experimental C, 74.00; H, 7.00 ; N, 5.70.

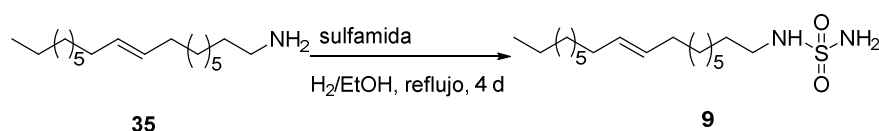
**Síntesis de ácido (S)-3-[3-(4-hexanamidobenzamido)fenil]-2-metilpropanoico (8)**



A una disolución de **29** (0.10 g, 0.18 mmol) en THF:H<sub>2</sub>O (3:1) (30 mL) a 0 °C se adiciona una disolución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 % (0.1 mL, 0.72 mmol), seguidamente se adiciona una disolución de LiOH en H<sub>2</sub>O (0.008 g, 0.36 mmol) y la mezcla de reacción se agita durante 2 h a t.a. A continuación, se adicifica con HCl 1 N (1 mL), se extrae con AcOEt (2x20 mL) y los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida y el crudo de reacción se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (EtOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> desde 0:100 hasta 6:94), obteniéndose **8** como (0.09 g, 62 %). P.f 200 °C.  $[\alpha]_D^{20} = 12.9$ . <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 12.18 (s, *J* = 13.7 Hz, 1H, COOH), 10.13 (s, 1H, NHCO), 10.03 (s, 1H, NHCO), 7.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-2,6), 7.71 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, H-3,5), 7.68 – 7.53 (m, 2H, 2H-Ar), 7.23 (m, 1H, H-Ar), 6.91 (m, 1H, H-Ar), 2.90 (m, 1H, H-4<sub>a</sub>), 2.61 (m, 3H, H-4<sub>b</sub>, H-2), 2.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 1.58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.28 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 1.05 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH), 0.87 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 176.7 (CO), 171.7 (CO), 164.7 (CO), 142.2, 139.9, 139.1, 128.7, 128.5 (2C), 128.2, 124.0, 120.7, 118.2, 118.1 (2C), 40.6 (CH), 38.6

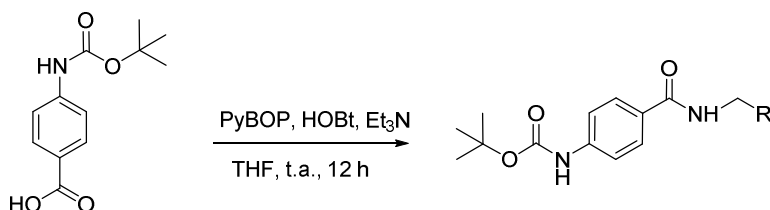
(C-4), 36.4 ( $\underline{\text{CH}_2\text{CO}}$ ), 30.9 ( $\text{CH}_2$ ), 24.6 ( $\text{CH}_2$ ), 21.9 ( $\text{CH}_2$ ), 16.7 ( $\underline{\text{CH}_2\text{CH}}$ ), 13.8 ( $\text{CH}_3$ ). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  15-95 % en 10.0 min,  $t_r = 7.93$  min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 236$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$ : C, 69.68; H, 7.12; N, 7.07; experimental C, 70.21; H, 7.08; N, 6.95.

### Síntesis de elaidilsulfamida (**9**)



Una disolución del **35** (0.11 g, 1.1 mmol) y sulfamida (0.31 g, 1.1 mmol) en  $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$  se agita durante 4 días a reflujo. A continuación, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage ( $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  desde 0:100 hasta 10:9), obteniéndose **9** como un sólido blanco (g, 39 %). P.f. 90 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 5.43 – 5.33 (m, 2H, H-9,10), 4.48 – 4.38 (sa, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 4.22 – 4.12 (sa, 1H, NH), 3.17 – 3.09 (m, 2H,  $\underline{\text{CH}_2\text{-NH}}$ ), 2.02 – 1.93 (m, 4H, H-8,11), 1.62 – 1.48 (m, 2H, H-2), 1.42 – 1.18 (m, 22H), 0.94 – 0.80 (t,  $J = 6.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 130.5, 130.2 (C-9,10), 43.6 (C-1), 32.6 (C-8), 32.5 (C-11), 31.8 (C-16), 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 26.6 (C-3), 22.7 ( $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$ ); 14.1 ( $\text{CH}_3$ ). Análisis elemental teórico  $\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{SO}_2$ : C: 62.38; H: 11.05; N: 8.08. Experimental C: 62.38; H: 11.35; N: 8.18.

### Procedimiento general

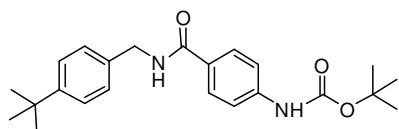


### Síntesis de 4-[N-(*tert*-butoxicarbamoil)amino]bencilamina (**10**)

A una disolución de **23** (0.20 g, 0.84 mmol) en THF (20 mL) se adiciona PyBOP (0.53 g, 1.01 mmol), HOBT (0.14 g, 1.01 mmol) y Et<sub>3</sub>N (0.14 mL, 1.01 mmol), la mezcla de reacción se mantiene a 0 °C durante unos minutos. A continuación, se adiciona bencilamina (0.11 mL, 1.01 mmol) y se agita durante 12 h a temperatura ambiente. El disolvente se elimina a presión reducida, y se acidifica con HCl 1 N (20 mL) y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y el disolvente se elimina a presión reducida. Finalmente, el crudo de reacción se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (AcOEt/hexano desde 5:95 hasta 10:90) obteniéndose el compuesto **10** como un sólido blanco (0.19 g, 80 %). P.f. 150 °C. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9.60 (s, 1H, NH), 8.86 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 7.80 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-2,6), 7.52 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-3,5), 7.38 – 7.18 (m, 5H), 4.45 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 1.47 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 165.7 (CO), 152.5 (CO), 142.3, 139.8, 128.2 (C-2,6), 128.0 (C-3,5), 127.6, 127.1, 126.1, 117.1, 79.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 42.5 (NHCH<sub>2</sub>), 28.0

(3CH<sub>3</sub>). Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 15-95% en 10 min, tr= 9.05 min, m/z [M+H]<sup>+</sup>= 327. Análisis elemental teórico C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C, 69.92; H, 6.79; N, 8.58; experimental C, 70.16; H, 6.49; N, 8.58.

### Síntesis de 4-[*N*-(*tert*-butoxicarbonil)amino]-*N*-(*tert*-butil)bencilamida (**11**)

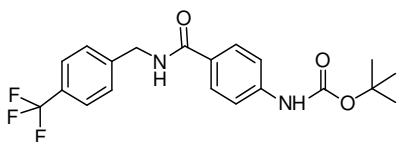


A una disolución de **23** (0.30 g, 1.26 mmol) en THF (20 mL) se adiciona de PyBOP (0.79 g, 1.52 mmol), Et<sub>3</sub>N (0.21 mL, 1.52 mmol) y HOBt (0.21 g, 1.52 mmol) y la mezcla de reacción se enfría a 0 °C durante unos minutos. A continuación, se adiciona 4-(*tert*-butil)-bencilamina (0.08 g, 1.52 mmol) y se mantiene con agitación constante a t.a. durante 12 h. El disolvente se elimina a presión reducida, el residuo se acidifica con HCl 1N (20 mL) y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna (sílica gel, hexano/acetato de etilo 6:4), obteniéndose el compuesto **11** como sólido blanco (0.3 g, 60 %). P.f. 112 °C. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.72 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-2,6), 7.42 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2',6'), 7.38 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3',5'), 7.29 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-3,5), 6.77 (s, 1H, NH), 6.37 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 4.59 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 1.51 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>), 1.31 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 166.7 (CO), 152.3 (CO), 150.6, 141.5, 135.2, 128.5, 128.0 (C-3,5), 127.8 (C-3',5'), 125.7 (C-2,6), 117.7 (C-2',6'), 81.0 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 43.8 (CH<sub>2</sub>), 34.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.3 (3CH<sub>3</sub>), 28.3 (3CH<sub>3</sub>). Gradiente



HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 15-95% en 5 min, tr= 5.71 min, m/z [M+H]<sup>+</sup>= 383. Análisis elemental teórico C<sub>23</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C, 72.22; H, 7.91; N, 7.32; experimental C, 72.51; H, 7.95; N, 7.20.

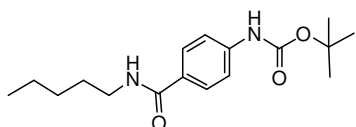
**Síntesis de 4-[N-(*tert*-butoxicarbonil)amino]-N-(4-trifluorometil)bencilamida (12)**



A una disolución de **23** (0.10 g, 0.42 mmol) en THF se adiciona PyBOP (0.26 g, 0.51 mmol), HOBt (0.07 g, 0.51 mmol), y Et<sub>3</sub>N (0.07 mL, 0.51 mmol); la mezcla de reacción se agita durante 10 minutos a 0°C. Finalmente, se añade 4-(trifluorometil)-bencilamina (0.07 mL, 0.51 mmol) y se agita durante 12 h a t.a. El disolvente se elimina a presión reducida, y el crudo de reacción se acidifica con HCl 1 N (20 mL). A continuación, se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) y los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida y el crudo se purifica por cromatografía en columna (sílica gel, hexano/acetato de etilo 6:4) obteniéndose el compuesto **12** como un sólido blanco (0.14 g, 84 %). P.f. 141 °C. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 9.61 (s, 1H, NH), 8.96 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 7.81 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, CH-Ar), 7.68 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, CH-Ar), 7.56 – 7.47 (m, 4H, CH-Ar), 4.52 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 1.47 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 165.8 (CO), 152.5 (CO), 144.7, 142.4, 128.0, 127.8 (C-2,6), 127.3 (C-3',5'), 125.9 (C-2',6'), 125.1 (c, *J* = 268 Hz, CF<sub>3</sub>), 117.1 (C-3,5), 79.4 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 42.2 (CH<sub>2</sub>), 28.0 (3CH<sub>3</sub>). Gradiente HPLC

CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 10-100% en 5 min, tr= 5.24 min, m/z [M+H]<sup>+</sup>= 395. Análisis elemental teórico C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C, 60.91; H, 5.37; N, 7.10; experimental C, 61.10; H, 5.25; N, 6.88.

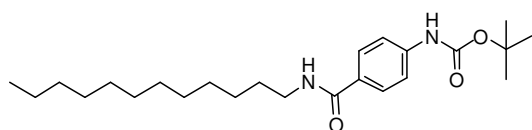
### Síntesis de *tert*-butil [4-(pentilcarbamoil)fenil]carbamato (**13**)



A una disolución de **23** (0.3 g, 1.26 mmol) en THF (20 mL) se adiciona PyBOP (0.78 g, 1.52 mmol), HOBt (0.21 g, 1.52 mmol) y Et<sub>3</sub>N (0.21 mL, 1.52 mmol); la mezcla de reacción se enfría a 0 °C durante unos minutos. A continuación, se adiciona 1-pentilamina (0.17 mL, 1.52 mmol) y la mezcla de reacción se agita durante 12 h a t.a. El disolvente se elimina a presión reducida y el crudo de reacción se acidifica con HCl 1 N (2x20 mL). A continuación, se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL), los extractos orgánicos se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. Finalmente, el crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna (sílica gel, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 2%) obteniéndose el compuesto **13** como un sólido naranja (0.12 g, 33 %). P.f. 99 °C. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.70 (d, *J* = 8.6 Hz, H-2,6), 7.42 (d, *J* = 8.6 Hz, H-3,5), 6.70 (sa, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 6.08 (s, 1H, NH), 3.41 – 3.38 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.52 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>), 1.40 – 1.29 (m, 6H, 3CH<sub>2</sub>), 0.91 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 166.8 (CO), 152.3 (CO), 141.2, 129.0, 127.9 (C-2,6), 117.7 (C-3,5), 81.0 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 40.0 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 28.2 (3CH<sub>3</sub>), 22.4 (CH<sub>2</sub>), 13.9 (CH<sub>3</sub>). Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 10-100% en 5 min, tr= 5.03 min, m/z [M+H]<sup>+</sup>= 307.

Análisis elemental teórico  $C_{17}H_{26}N_2O_3$ : C, 66.64; H, 8.55; N, 9.14; experimental C, 66.20; H, 8.30; N, 9.11.

### Síntesis de *tert*-butil [4-(dodecilcarbamoi)fenil]carbamato (**14**)



A una disolución de **23** (0.20 g, 0.84 mmol) en THF (20 mL) se añade EDC (0.19 g, 1.01 mmol), HOBt (0.14 g, 1.01 mmol) y  $Et_3N$  (0.14 mL, 1.01 mmol), y la mezcla de reacción se mantiene a 0 °C durante unos minutos. A continuación, se adiciona 1-dodecilamina (0.23 mL, 1.01 mmol) y se agita durante 12 h a t.a. El disolvente se elimina a presión reducida y el crudo de reacción se redisuelve en  $CH_2Cl_2$  (20 mL) y se acidifica con HCl 1 N (20 ml). A continuación, se extrae con  $CH_2Cl_2$  (20 mL) y los extractos orgánicos se secan sobre  $Na_2SO_4$  anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida y el crudo de reacción se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (AcOEt/hexano desde 5:95 hasta 10:90) obteniéndose el compuesto **14** como un sólido blanco (0.22 g, 65 %). P.f. 110 °C.  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.69 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-2,6), 7.42 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-3,5), 6.70 (s, 1H, NHCO-O), 6.12 (sa, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 3.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 1.61 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.52 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>), 1.42 – 1.17 (m, 18H, 9CH<sub>2</sub>), 0.86 (t,  $J = 7.1$ , 3H, CH<sub>3</sub>).  $^{13}C$  RMN (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 166.8 (CO), 152.3 (CO), 141.3, 128.9, 127.9 (C-2,6), 117.7 (C-3,5), 81.0 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 40.1 (CH<sub>2</sub>N), 31.9 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.54 (CH<sub>2</sub>), 29.50 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (3CH<sub>2</sub>), 28.3 (3CH<sub>3</sub>), 27.0 (CH<sub>2</sub>), 22.6 (CH<sub>2</sub>), 14.1 (CH<sub>3</sub>). Gradiente HPLC  $CH_3CN/H_2O$  20-95%

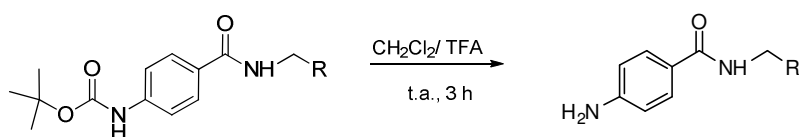
en 10 min,  $t_r = 6.0$  min,  $m/z$   $[M+H]^+ = 405$ . Análisis elemental teórico  $C_{24}H_{40}N_2O_3$ : C, 71.25; H, 9.97; N, 6.92; experimental C, 71.08; H, 10.12; N, 6.63.

### Síntesis de *tert*-butil [4-((ciclohexilmetil)carbamoil)fenil]carbamato (**15**)

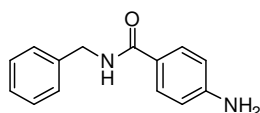
A una disolución de **23** (0.14 g, 0.57 mmol) en DMF (20 mL) se adiciona EDC (0.17 g, 0.88 mmol), HOBT (0.12 g, 0.88 mmol), y  $Et_3N$  (0.12 mL, 0.88 mmol); la mezcla de reacción se agita durante 10 minutos a 0 °C. A continuación, se adiciona ciclohexilmetilamina (0.11 mL, 0.88 mmol) y la mezcla de reacción se agita durante 12 h a t.a. El disolvente se elimina a presión reducida; el crudo de reacción se disuelve en  $CH_2Cl_2$  (20 mL) y se acidifica con HCl 1 N (10 mL). A continuación, se extrae con  $CH_2Cl_2$  (2x20 mL), los extractos orgánicos se secan sobre  $MgSO_4$  anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. Finalmente, el crudo se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (AcOEt/hexano desde 5:95 hasta 10:90) obteniéndose el compuesto **15** como sólido blanco (0.06 g, 31 %). P.f. 114 °C.  $^1H$  RMN (300 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9.56 (s, 1H, NH), 8.24 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 7.74 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-2,6), 7.49 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H, H-3,5), 3.05 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 1.67 (m, 5H), 1.47 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>), 1.24 – 1.01 (m, 4H), 0.90 (m, 2H).  $^{13}C$  RMN (75 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 165.7 (CO), 152.6 (CO), 142.0, 128.06, 127.9 (C-2,6), 117.0 (C-3,5), 79.4 (OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 45.3 (NHCH<sub>2</sub>), 37.5 (C-1'), 30.5 (C-3',5'), 28.0 (3CH<sub>3</sub>), 26.1 (C-4'), 25.4 (C-2',6'). Gradiente HPLC  $CH_3CN/H_2O$  15-95% en 10 min,  $t_r = 6.02$  min,  $m/z$

$[M+H]^+ = 333$ . Análisis elemental teórico  $C_{19}H_{28}F_3N_2O_3$ : C, 68.65; H, 8.49; N, 8.43; experimental C, 68.40; H, 8.70; N, 8.20.

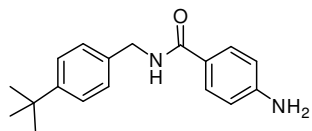
### Procedimiento general



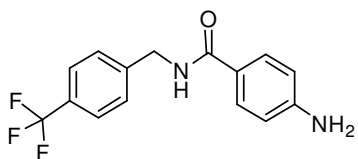
### Síntesis de 4-amino-*N*-bencilbenzamida (**16**)



A una disolución del compuesto **10** (0.35 g, 1.07 mmol) en  $CH_2Cl_2$  (20 mL) se añade ácido trifluoracético (20 mL), la mezcla de reacción se mantiene con agitación constante y a t.a. durante 5 h. A continuación, el disolvente se elimina a presión reducida y el crudo de reacción se disuelve en una mezcla  $CH_2Cl_2$ / NaOH 1 M (1:1) (20 mL). Finalmente, se extrae con  $CH_2Cl_2$  y los extractos orgánicos se secan sobre  $MgSO_4$  anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida obteniéndose **16** como un sólido blanco (0.22 g, 92 %). P.f. 150 °C.  $^1H$  RMN (300 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8.55 (t,  $J = 6.1$  Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 7.62 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-2,6), 7.40 – 7.17 (m, 5H, H-Ar), 6.54 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-3,5), 5.60 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.42 (d,  $J = 5.9$  Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>).  $^{13}C$  RMN (75 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 166.2 (CO), 151.6, 140.3, 128.7 (C-2,6), 128.1, 127.1, 126.5, 125.3, 124.2, 121.0, 112.5 (C-3,5), 42.3 (CH<sub>2</sub>). Gradiente HPLC  $CH_3CN/H_2O$  15-95% en 10 min,  $t_r = 8.5$  min,  $m/z$   $[M+H]^+ = 227$ . Análisis elemental teórico  $C_{14}H_{14}N_2O$ : C, 74.31; H, 6.24; N, 12.38. Experimental C, 74.39; H, 6.43; N, 12.55.

**Síntesis de 4-amino-N-[4-(tert-butil)bencil]benzamida (17)**

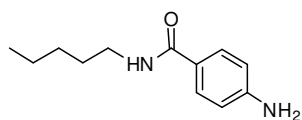
A una disolución del compuesto **11** (0.20 g, 0.52 mol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) se añaden 20 mL de ácido trifluoroacético, la mezcla de reacción se mantiene con agitación constante y a t.a. durante 5 h. A continuación, el disolvente se elimina a presión reducida y el crudo de reacción se disuelve en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / NaOH 1 M (1:1) (20 mL), la mezcla se agita durante 10 min. Finalmente, se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y los extractos orgánicos se secan sobre  $\text{MgSO}_4$ . El disolvente se elimina a presión reducida obteniéndose **17** como un sólido blanco (0.13 g, 90 %). P.f. 113 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.62 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, H-2,6), 7.37 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H, H-2',6'), 7.29 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H, H-3',5'), 6.64 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, H-3,5), 4.59 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2$ ), 1.32 (s, 9H, 3 $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 167.0 (CO), 150.5, 149.5, 135.5, 128.7 (C-2,6), 127.7 (C-3',5'), 125.6 (C-2',6'), 124.0, 114.1 (C-3,5), 43.7 ( $\text{CH}_2$ ), 34.5 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 31.3 (3 $\text{CH}_3$ ). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  10-100 % en 5 min,  $t_r$  = 4.67 min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  = 283. Análisis elemental teórico  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$ : C, 76.56; H, 7.85; N, 9.92. Experimental C, 76.71; H, 8.10; N, 9.94.

**Síntesis de 4-amino-N-(4-(trifluorometil)bencil)benzamida (18)**

A una disolución del compuesto **12** (0.20 g, 0.51 mol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) se añade ácido

trifluoracético (20 mL), la mezcla de reacción se mantiene con agitación constante y a t.a. durante 5 h. A continuación, el disolvente se elimina a presión reducida y el crudo de reacción se disuelve en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ / NaOH 1 M (1:1) (20 mL). Finalmente, se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y los extractos orgánicos se secan sobre  $\text{MgSO}_4$ . El disolvente se elimina a presión reducida obteniéndose **18** como un sólido blanco (0.14 g, 92 %). P.f. 113 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.63 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H, H-2,6), 7.58 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 2H, H-2',6'), 7.44 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 2H, H-3',5'), 6.65 (d,  $J$  = 8.0 Hz, H-3,5), 6.42 (sa, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 4.67 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2$ ), 4.34 – 3.49 (sa, 2H,  $\text{NH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 167.2 (CO), 149.8, 142.8, 131.1, 128.8 (C-2,6), 127.9 (C-3',5'), 125.7 (C-2',6'), 125.6, 124.9 (c,  $J$  = 268 Hz,  $\text{CF}_3$ ), 114.1 (C-3,5), 43.4 ( $\text{CH}_2$ ). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  10-100 % en 5 min,  $t_r$  = 4.21 min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  = 295. Análisis elemental teórico  $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}$ : C, 61.22; H, 4.45; N, 9.52; experimental C, 61.23; H, 4.60; N, 9.60.

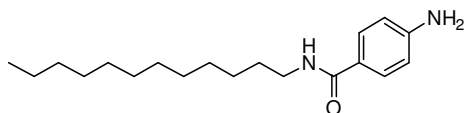
### Síntesis de 4-amino-*N*-pentilbenzamida (**19**)



Una disolución del compuesto **13** (0.76 g, 3.68 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /TFA (1:1) (40 mL) se agita durante 4 h a t.a. A continuación, el disolvente se elimina a presión reducida y el crudo de reacción se disuelve en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /NaOH 1 M (1:1) (30 mL). A continuación, la fase acuosa se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL), los extractos orgánicos se lavan con una disolución saturada de NaCl y se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. Finalmente,

el disolvente se elimina a presión reducida obteniéndose el compuesto **19** como un sólido amarillo (0.44 g, 85 %). P.f. 100 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.58 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-2,6), 6.64 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-3,5), 6.01 (sa, 1H,  $\text{NHCH}_2$ ), 3.40 – 3.37 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.57 – 1.51 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.43 – 1.24 (m, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 0.99 – 0.79 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 167.2 (CO), 149.4, 128.5 (C-2,6), 124.4, 114.1 (C-3,5), 40.0 ( $\text{CH}_2$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ ), 29.1 ( $\text{CH}_2$ ), 22.4 ( $\text{CH}_2$ ), 14.0 ( $\text{CH}_3$ ). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  15-95 % en 5 min,  $t_r = 3.7$  min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 207$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$ : C, 69.87; H, 8.80; N, 13.58; experimental C, 69.23; H, 8.60; N, 13.60.

### Síntesis de 4-amino-*N*-dodecilbenzamida (**20**)

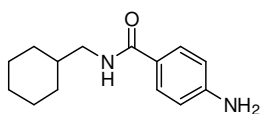


A una disolución del compuesto **14** (0.20 g, 0.49 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) se añade ácido trifluoracético (20 mL), la mezcla de reacción se mantiene con agitación constante y a t.a. durante 5 h. A continuación, el disolvente se elimina a presión reducida y el crudo de reacción se disuelve en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{NaOH}$  1M (1:1) (20 mL), la mezcla se agita vigorosamente durante 10 min. Finalmente, se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y los extractos orgánicos se secan sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida obteniéndose **20** como un sólido blanco (0.14 g, 92 %). P.f. 112 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.59 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-2,6), 6.65 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-3,5), 6.05 – 5.91 (sa, 1H, NH,  $\text{NHCH}_2$ ),



3.40 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2$ ), 1.65 – 1.50 (m, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.45 – 1.16 (m, 18H, 9 $\text{CH}_2$ ), 0.87 (t,  $J = 7.1$ , 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 167.2 (CO), 149.3, 128.9, 127.8 (C-2,6), 114.1 (C-3,5), 39.9 ( $\text{NHCH}_2$ ), 31.9 ( $\text{CH}_2$ ), 29.8 ( $\text{CH}_2$ ), 29.6 (3 $\text{CH}_2$ ), 29.3 (3 $\text{CH}_2$ ), 27.0 ( $\text{CH}_2$ ), 22.7 ( $\text{CH}_2$ ), 14.1 ( $\text{CH}_3$ ). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  15-95 % en 10 min,  $t_r = 11.0$  min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 305$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}$ : C, 74.95; H, 10.59; N, 9.20; experimental C, 74.60; H, 10.55; N, 9.16.

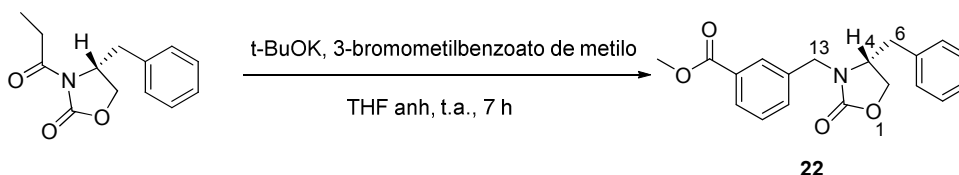
#### 4-amino-*N*-(ciclohexilmetil)benzamida (**21**)



A una disolución del compuesto **15** (0.20 g, 0.60 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) se añaden 20 mL de ácido trifluoracético, la mezcla de reacción se mantiene con agitación constante y a t.a. durante 5 h. A continuación, el disolvente se elimina a presión reducida y el crudo de reacción se disuelve en una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{NaOH}$  1 M (1:1). Finalmente, se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y los extractos orgánicos se lavan con una disolución saturada de NaCl, y se secan sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida obteniéndose **21** como un sólido blanco (0.11 g, 80 %). P.f. 150 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7.92 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 7.54 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-2,6), 6.50 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H, H-3,5), 5.60 – 5.48 (m, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3.08 – 2.92 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 1.66 – 1.62 (m, 5H), 1.47 – 1.41 (m, 1H), 1.13 – 1.11 (m, 3H), 0.95 – 0.77 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 165.7 (CO), 142.0, 128.1, 127.6 (C-2,6), 116.0 (C-3,5), 45.3 ( $\text{NHCH}_2$ ), 37.5 (C-1'), 30.5 (C-3',5'), 26.1 (C-

4'), 25.4 (C-2',6'). Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 15-95 % en 5.0 min, tr= 5.34 min, m/z [M+H]<sup>+</sup>= 333. Análisis elemental teórico C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O: C, 72.38; H, 8.68; N, 12.06; experimental C, 72.60; H, 8.55; N, 12.16.

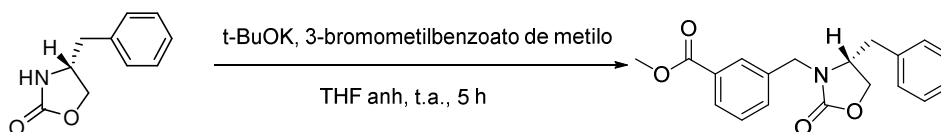
**Síntesis de (*R*) 3-[(4-bencil-2-oxooxazolidin-3-il)metil]benzoato de metilo (22)**



A una disolución de (*R*)-(-)-4-bencil-3-propioniloxazolidin-2-ona (0.12 g, 5.24 mmol) en THF anhidro (13 mL) se añade *tert*-butóxido potásico (0.6 g, 5.24 mmol) y la mezcla de reacción se agita durante 45 min a t.a., bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. A continuación, se añade 3-(bromometil)benzoato de metilo (1.0 g, 4.36 mmol) y se agita durante 6 h a t.a. A continuación, se adiciona una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (10 mL) a la mezcla de reacción y se extrae con AcOEt (10 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna (sílica gel, Hex/AcOEt 7:3 v/v) obteniéndose **22** como un sólido blanco (0.43 g, 62 %). P.f. 62 °C. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.06 – 7.95 (m, 1H, H-Ar), 7.90 – 7.88 (m, 1H, H-Ar), 7.54 – 7.40 (m, 2H, H-Ar), 7.36 – 7.22 (m, 3H, H-Ar), 7.12 – 7.02 (m, 2H, H-Ar), 4.86 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 4.18 (m, 2H), 4.10 – 4.02 (m, 1H), 3.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.89 – 3.77 (m, 1H), 3.09 (dd, *J*<sub>ab</sub> = 13.6,

$J_{a4} = 4.7$  Hz, 1H, H-6<sub>a</sub>), 2.66 (dd,  $J_{ba} = 13.6$ ,  $J_{b4} = 8.9$  Hz, 1H, H-6<sub>b</sub>).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 166.5 (CO), 157.9 (C-2), 136.4 (C-7), 135.4 (C-14), 132.4 (C-19), 130.8 (C-16), 129.3 (C-9), 129.1 (C-11), 129.0 (C-18), 128.9 (C-8), 127.1 (C-10), 67.0 (C-5), 55.5 (C-4), 51.9 ( $\text{OCH}_3$ ), 45.9 (C-13), 38.3 (C-6). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  15-95 % en 5.0 min,  $t_r = 4.8$  min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 326$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ : C, 70.14; H, 5.89; N, 4.31; experimental C, 70.31; H, 5.67; N, 4.60.

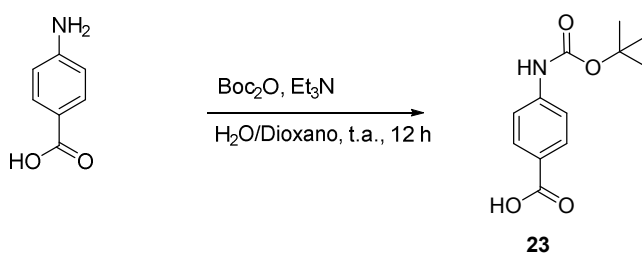
**Síntesis de (*R*) 3-[(4-bencil-2-oxoxazolidin-3-il)metil]benzoato de metilo (22)**



A una disolución de (*R*)-4-bencil-2-oxazolidinona (0.20 g, 1.13 mmol) en THF anhidro (13 mL) se añade *tert*-butóxido potásico (0.25 g, 2.26 mmol), y la mezcla de reacción se agita durante 45 minutos a t.a. y bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ . A continuación, se añade 3-(bromometil)benzoato de metilo (1 g, 4.36 mmol) y se agita durante 4 h a t.a. A continuación, se adiciona una disolución saturada de cloruro de amonio a la mezcla de reacción y se extrae con  $\text{AcOEt}$  (20 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se purifica cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage ( $\text{AcOEt}$ /hexano desde 5:95 hasta

10:90) obteniéndose **22** como un sólido blanco (0.43 g, 65 %). P.f. 62 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.06 – 7.95 (m, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.54 – 7.40 (m, 2H), 7.36 – 7.22 (m, 3H), 7.12 – 7.02 (m, 2H), 4.86 (m, 1H), 4.18 (m, 2H), 4.10 – 4.02 (m, 1H, H-4), 3.93 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.89 – 3.77 (m, 1H), 3.09 (dd,  $J_{ab}=13.6$ ,  $J_{a4}=4.7$  Hz, 1H, H-6), 2.66 (dd,  $J_{ba}=13.6$ ,  $J_{b4}=8.9$  Hz, 1H, H-6).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 166.5 (C-20), 157.9 (C-2), 136.4 (C-7), 135.4 (C-14), 132.4 (C-19), 130.8 (C-16), 129.3 (C-9), 129.1 (C-11), 129.0 (C-18), 128.9 (C-8), 127.1 (C-10), 67.0 (C-5), 55.5 (C-4), 51.9 (C-21), 45.9 (C-13), 38.3 (C-6). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  15-95 % en 5.0 min,  $t_r=4.8$  min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+=326$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ : C, 70.14; H, 5.89; N, 4.31; experimental C, 70.31; H, 5.67; N, 4.60.

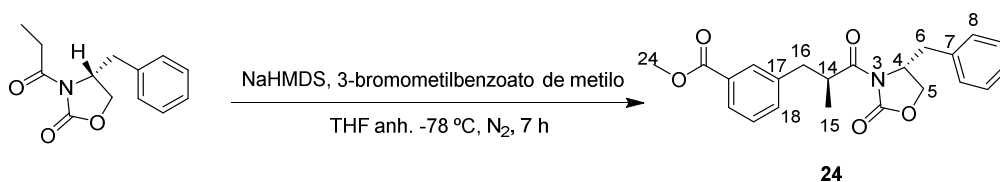
### Síntesis de ácido 4-[(*tert*-butoxicarbonil)amino] benzoico (**23**)



A una mezcla de ácido 4-aminobenzoico (0.2 g, 1.5 mmol) en dioxano (4.0 mL) y  $\text{H}_2\text{O}$  (2 mL) se adiciona trietilamina (0.4 mL, 3.0 mmol) seguido de di-*tert*-butildicarbonato (0.6 g, 3.0 mmol). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 h. El disolvente se elimina a presión reducida, y el residuo se acidifica con  $\text{HCl}$  1 N. El precipitado obtenido se lava con  $\text{H}_2\text{O}$ , obteniéndose

**23** (0.4 g, 89 %) como un sólido blanco. P.f. 181 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 12.21 (s, 1H, COOH), 9.71 (s, 1H, NH), 7.82 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-2,6), 7.54 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H, H-3,5), 1.44 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  167.4 (CO<sub>2</sub>H), 152.9 (CONH), 144.1, 130.3 (C-2,6), 124.4, 117.6 (C-3,5), 80.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 28.4 (3CH<sub>3</sub>). Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 15-95% en 10 min, tr= 4.25 min, m/z [M+H]<sup>+</sup> = 237. Análisis elemental teórico C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>: C, 60.75; H, 6.37; N, 5.90; experimental C, 60.84; H, 6.09; N, 5.95.

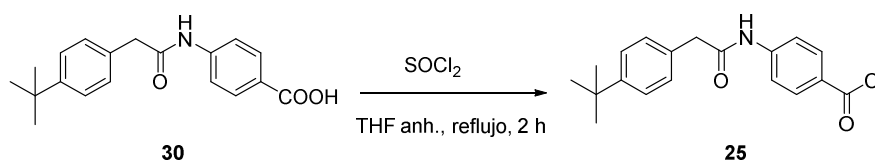
**Síntesis de benzoato de 3-[(*S*)-3-[(*R*)-4-bencil-2-oxooxazolidin-3-il]-2-metil-3-oxopropil] de metilo (**24**)**



Una disolución de (*R*)-(-)-4-bencil-2-propionil-2-oxazolidinona (0.50 g, 2.15 mmol) en THF anhidro (11 mL) se agita durante 15 min, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, a -78 °C. A continuación, se añade NaHMDS/THF 1M (2.36 mL, 2.36 mmol) y se agita durante 1 h a -78 °C. Finalmente, a la mezcla de reacción se añade una disolución de 3-bromometilbenzoato de metilo (0.54 g, 2.3 mmol) y se agita durante 6 h a -78 °C. El crudo de reacción se trata con una solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (10 mL) y se extrae con AcOEt (10 mL), los extractos orgánicos se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía en columna (sílica, hexano/AcOEt 6:4 v/v;

obteniéndose **24** como un sólido cristalino (0.41 g, 60 %). Pf. 98 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.93 – 7.91 (m, 1H, H-Ar), 7.90 – 7.80 (m, 1H, H-Ar), 7.51 – 7.41 (m, 1H, H-Ar), 7.37 – 7.30 (m, 1H, H-Ar), 7.26 – 7.11 (m, 3H, H-Ar), 7.05 – 6.90 (m, 2H, H-Ar), 4.67 – 4.62 (m, 1H, H-4), 4.18 – 4.15 (m, 1H, H-5<sub>a</sub>), 4.12 – 4.10 (m, 1H, H-5<sub>b</sub>), 4.11 – 3.98 (m, 1H, H-14), 3.87 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.21 (dd,  $J_{\text{ba}} = 13.5$  Hz,  $J_{\text{b14}} = 7.3$  Hz, 1H, H-16<sub>a</sub>), 3.12 (dd,  $J_{\text{ab}} = 13.5$  Hz,  $J_{\text{a4}} = 3.4$  Hz, 1H, H-6<sub>a</sub>), 2.73 (dd,  $J_{\text{ab}} = 13.5$  Hz,  $J_{\text{a14}} = 7.16$  Hz, 1H, H-16<sub>a</sub>), 2.57 (dd,  $J_{\text{ba}} = 13.5$  Hz,  $J_{\text{b4}} = 9.5$  Hz, 1H, H-6<sub>b</sub>), 1.19 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  (75MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 176.6 (CO), 167.5 (CO), 153.4 (CO), 140.0, 139.7, 135.5, 134.4, 130.8, 129.8, 129.3, 128.9, 128.3, 127.7, 66.4 (C-5), 55.6 (C-4), 50.9 ( $\text{CH}_3$ ), 40.0 (C-14), 39.9 (C-16), 38.2 (C-6), 17.1 ( $\text{CH}_3$ ). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  15-95 % en 10.0 min,  $t_r = 4.8$  min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 382$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_5$  teórico C: 69.28; H, 6.08; N, 3.67. Experimental: C, 69.36; H, 5.87; N, 3.94.

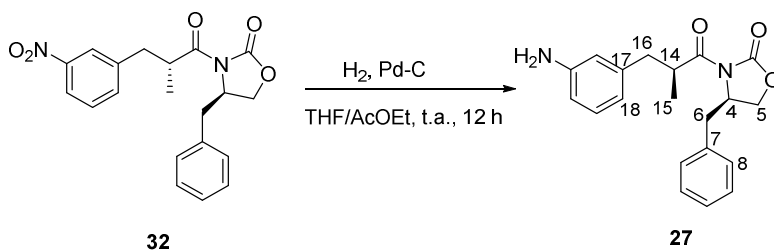
### Síntesis de cloruro de 4-[2-(4-(*tert*-butil)fenil)acetamido]bencilo (**25**)



A una disolución del compuesto **30** (0.10 g, 0.32 mmol) en THF anh. se añade cloruro de tionilo (2 mL), y la mezcla de reacción se agita a reflujo durante 2 h. El disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose 0.11 g del compuesto **25**.

**Síntesis de cloruro de 4-hexanamidobencilo (26)**

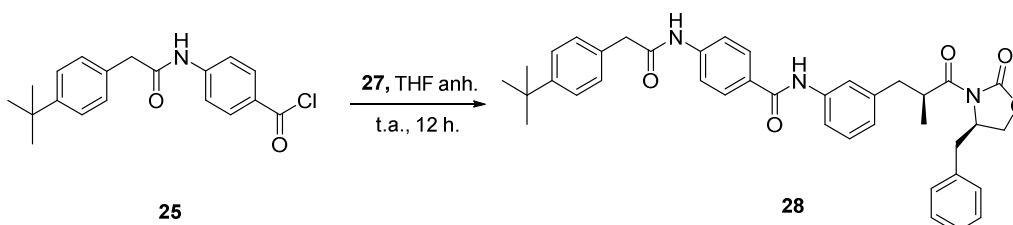
A una disolución del compuesto **31** (0.10 g, 0.43 mmol) en THF anh. se añade cloruro de tionilo (2 mL), y la mezcla de reacción se agita a reflujo durante 2 h. El disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose 0.11 g del compuesto **26**.

**Síntesis de (*R*)-3-[(*S*)-3-(3-aminofenil)-2-metilpropanoil]-4-benciloxazolidin-2-ona (27)**

A una disolución de **32** (0.25 g, 0.68 mmol) en THF/AcOEt (1:2) (20 mL) se adiciona Pd-C 10 % (catalítico) y la mezcla se hidrogena en un PAR a 21 psi y t.a. durante 12 h. Finalmente, la mezcla de reacción se filtra a través de filtros PVDF (30 mm, 0.45  $\mu$ , pk100) y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose **27** como un aceite (0.21 g, 90 %).  $[\alpha]_D^{20} = -14.8$ .  $^1\text{H}$  RMN (300

MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.30 – 7.24 (m, 2H, H-Ar), 7.20 (m, 3H, H-Ar), 7.15 – 7.06 (m, 2H, H-Ar), 7.00 (m, 2H, H-Ar), 4.65 (m, 1H), 4.20 – 4.01 (m, 3H), 3.17 – 2.98 (m, 2H), 2.62 (m, 2H), 1.16 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 176.4 (CO), 153.1 (CO), 140.8, 135.2, 135.2 (2C), 129.2 (2C), 128.9, 127.1, 120.5 (2C), 117.8, 66.0 (C-5), 55.2 (C-4), 39.6 (C-14), 39.2 (C-16), 37.5 (C-6), 16.5 ( $\text{CH}_3$ ). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  15-95 % en 10.0 min,  $t_r = 6.94$  min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 338$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5$ : C, 70.99; H, 6.55; N, 8.28; experimental C, 71.04; H, 6.78; N, 8.19.

**Síntesis de *N*[3-((*S*)-3-((*R*)-4-bencil-2-oxooxazolidin-3-il)-2-metil-3-oxopropil)fenil]-4-(2-(4-(*tert*-butil)fenil)acetamido]benzamida (28)**

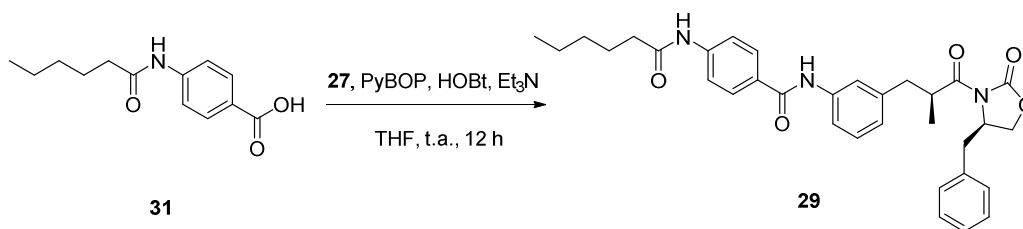


A una disolución de **27** (0.16 g, 0.56 mmol) en THF anh. (20 mL) se adiciona una disolución de **25** en THF anh. (10 mL), y la mezcla de reacción se mantiene durante 12 h a t.a, bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ . A continuación, la mezcla de reacción se acidifica con HCl 1 N (10 mL), se extrae con AcOEt (20 mL) y la fase orgánica se lava con una disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . El extracto orgánico se seca sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en



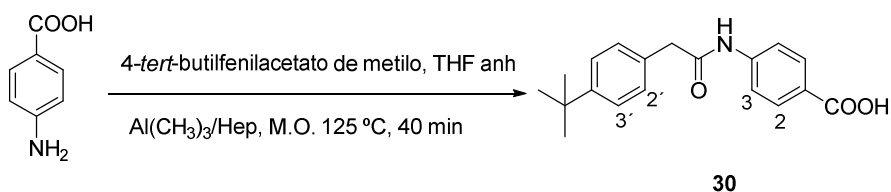
sistema Biotage (AcOEt/hexano desde 5:95 hasta 10:90) obteniéndose **28** como un sólido amarillo (0.24 g, 68 %). P.f. 130 °C.  $[\alpha]_D^{20} = -16.9$ .  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.75 (m, 2H, H-Ar), 7.68 – 7.60 (m, 1H, H-Ar), 7.54 (m, 2H, H-Ar), 7.44 (m, 3H, H-Ar), 7.32 – 7.20 (m, 6H, H-Ar), 7.13 – 7.00 (m, 3H, H-Ar), 4.66 (m, 1H, CH), 4.23 – 4.00 (m, 3H,  $\text{CH}_2/\text{CH}$ ), 3.74 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.25 – 3.06 (m, 2H), 2.63 (m, 2H), 1.34 (s, 9H, 3 $\text{CH}_3$ ), 1.18 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 176.4 (CO), 176.3 (CO), 169.5 (CO), 153.1 (C-2), 150.9, 140.8, 140.2, 138.0, 135.1, 130.8, 129.4 (2C), 129.2 (2C), 129.1, 128.9 (2C), 128.1 (2C), 127.3, 126.3 (2C), 125.5, 120.8, 119.3 (2C), 118.4, 66.0 (C-5), 55.2 (C-4), 44.5 ( $\text{CH}_2$ ), 39.7 (C-14), 39.6 (C-16), 37.8 (C-6), 34.6 ( $\text{C}(\text{CH}_3)$ ), 31.3 (3 $\text{CH}_3$ ), 16.5 ( $\text{CH}_3$ ). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  30-95 % en min,  $t_r = 8.78$  min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 632$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{39}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_5$ : C, 74.14; H, 6.54; N, 6.65; experimental C, 73.89; H, 6.82; N, 6.41.

**Síntesis de *N*[3-((*S*)-3-((*R*)-4-bencil-2-oxooxazolidin-3-il)-2-metil-3-oxopropil)fenil]-4-hexanamidobenzamida (**29**)**



A una disolución de **31** (0.39 g, 1.65 mmol) en THF (20 mL) se adiciona  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.92 mL, 6.6 mmol), HOBt (0.22 g, 1.65 mmol) y PyBOP (0.86 g, 1.65 mmol) y la

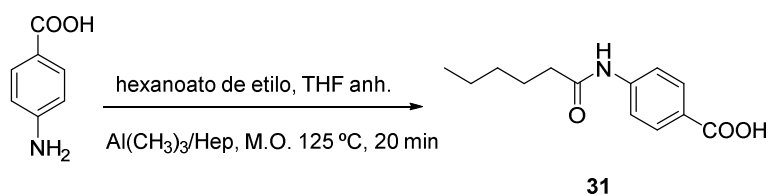
mezcla de reacción se mantiene durante 5 min a 0 °C. A continuación, se adiciona una de disolución de **27** (0.37 g, 1.1 mmol) en THF y la mezcla de reacción se mantiene durante 12 h a t.a. Finalmente, se acidifica con HCl 1 N (10 mL) y se extrae con AcOEt (20 mL). La fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaCl y el extracto orgánico se seca sobre MgSO<sub>4</sub> anh. El crudo se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (AcOEt/hexano desde 5:95 hasta 10:90), obteniéndose **29** como un sólido blanco (0.21 g, 34 %). P.f. 141 °C.  $[\alpha]_D^{20} = -32.2$ . <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.13 – 8.10 (sa, 1H, NH), 7.86 – 7.81 (sa, 1H, NH), 7.76 – 7.70 (m, 2H, H-Ar), 7.67 – 7.54 (m, 3H, H-Ar), 7.47 – 7.37 (m, 2H, H-Ar), 7.24 – 7.15 (m, 4H, H-Ar), 7.11 – 7.00 (m, 2H, H-Ar), 4.67 – 4.57 (m, 1H, H-4), 4.22 – 4.01 (m, 3H), 3.14 – 3.06 (m, 2H), 2.62 – 2.50 (m, 2H), 2.36 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CO), 1.70 – 1.59 (m, 2H), 1.37 – 1.23 (m, 4H), 1.16 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH), 0.97 – 0.79 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 176.3 (CO), 172.1 (CO), 165.3 (CO), 153.2 (C-2), 141.3, 140.1, 138.1, 135.1, 129.9, 129.3 (2C), 129.0, 128.9 (2C), 128.2 (2C), 127.3 (2C), 125.5, 121.0, 119.3, 118.6, 66.0 (C-5), 55.2 (C-4), 39.7 (C-14), 39.6 (C-16), 37.8 (C-6), 37.7 (CH<sub>2</sub>CO), 31.4 (CH<sub>2</sub>), 25.2 (CH<sub>2</sub>), 22.4 (CH<sub>2</sub>), 16.5 (CH<sub>3</sub>CH), 13.9 (CH<sub>3</sub>). Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 30-95 % en 10 min, tr = 7.70 min, m/z [M+H]<sup>+</sup> = 556. Análisis elemental teórico C<sub>33</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: C, 71.33; H, 6.71; N, 7.56; experimental C, 71.18 ; H, 6.42 ; N, 7.31.

**Síntesis de Ácido 4-(2-(4-(*tert*-butil)fenil)acetamido)benzoico (30)**

A una disolución de ácido 4-aminobenzoico (0.20 g, 1.46 mmol) en THF anh. se adiciona 4-*tert*-butilfenilacetato de metilo (0.45 mL, 2.19 mmol) y  $\text{Al}(\text{CH}_3)_3/\text{Hep}$  2.0 M (1.10 mL, 2.19 mmol), y la mezcla de reacción se calienta en un reactor de microondas a 125 °C durante 40 min. A continuación, sobre la mezcla de reacción se adiciona gota a gota HCl 1 N hasta el cese de efervescencia, y se extrae con AcOEt (2x20 mL). La fase orgánica se lava con una disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mL) y el extracto orgánico se seca sobre  $\text{MgSO}_4$  anh. El crudo se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (EtOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  desde 0:100 hasta 6:94), obteniéndose **30** como un sólido blanco (0.30 g, 65 %). P.f. 155 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 12.66 (s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ), 10.43 (s, 1H, NH), 7.86 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-2,6), 7.69 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, H-3,5), 7.33 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-2',6'), 7.24 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H, H-3',5'), 3.61 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 1.34 (s, 9H, 3 $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 169.8(CO) , 166.8 (CO), 148.9, 143.2, 132.6, 130.3 (C-2,6), 128.7 (C-2',6'), 125.1 (C-3',5'), 118.3 (C-3,5), 49.2 ( $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 34.1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 31.1 (3 $\text{CH}_3$ ). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  15-95 % en 10.0 min,  $t_r = 5.25$  min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ =$

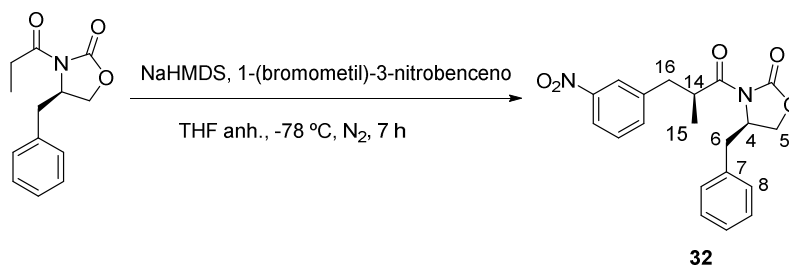
312. Análisis elemental teórico  $C_{19}H_{21}NO_3$ : C, 73.29; H, 6.80; N, 4.50; experimental C, 73.10; H, 6.78; N, 4.52.

### Síntesis de Ácido 4-hexanamidobenzoico (31)



A una disolución de ácido *p*-aminobenzoico (0.25 g, 1.81 mmol) en THF (20 mL) se adiciona hexanoato de etilo (0.6 g, 3.64 mmol) y  $Al(CH_3)_3$ /heptano 2 M, la mezcla de reacción se calienta en un reactor de microondas a 125 °C durante 20 min. A continuación, la mezcla de reacción se trata con HCl 1 N (10 mL) hasta el cese de la efervescencia obteniéndose un precipitado. El sólido se lava con  $H_2O$  (2x10 mL), obteniéndose **31** como un sólido blanco (0.30 g, 70 %). P.f. 245 °C.  $^1H$  RMN (300 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 12.65 (s, 1H,  $CO_2H$ ), 10.15 (s, 1H, NH), 7.86 (d,  $J$ = 8.7 Hz, 2H, H-2,6), 7.69 (d,  $J$ = 8.7 Hz, 2H, H-3,5), 2.32 (t,  $J$ = 7.4 Hz, 2H,  $\underline{CH_2CO}$ ), 1.65 – 1.46 (m, 2H,  $CH_2$ ), 1.40 – 1.18 (m, 4H,  $2CH_2$ ), 0.95 – 0.75 (t,  $J$ = 6.7 Hz, 3H,  $CH_3$ ).  $^{13}C$  RMN (75 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 171.8 (CO), 166.9 (CO), 143.3, 130.3 (C-2,6), 124.7, 118.2 (C-3,5), 36.4 ( $\underline{CH_2CO}$ ), 30.8 ( $CH_2$ ), 24.6 ( $CH_2$ ), 21.9 ( $CH_2$ ), 13.8 ( $CH_3$ ). Gradiente HPLC  $CH_3CN/H_2O$  15-95 % en 10.0 min,  $tr$ = 7.93 min,  $m/z$   $[M+H]^+$ = 236. Análisis elemental teórico  $C_{13}H_{17}NO_3$ : C, 66.36; H, 7.28; N, 5.95; experimental C, 66.50; H, 7.50; N, 5.84.

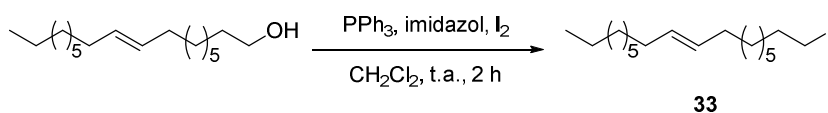
**Síntesis de (*R*)-4-bencil-3-[(*S*)-2-metil-3-(3-nitrofenil)propanoil]oxazolidin-2-ona (**32**)**



Una disolución de (*R*)-(-)-4-bencil-2-propionil-2-oxazolidinona (0.60 g, 2.58 mmol) en THF anhidro (11 mL) se agita durante 15 min bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, a -78 °C. A continuación, se añade NaHMDS/THF 1 M (2.84 mL, 2.84 mmol) y se agita durante 1 h a -78 °C. Finalmente, a la mezcla de reacción se añade una disolución de 1-(bromometil)-3-nitrobenceno (0.61 g, 2.84 mmol) en THF anh. y se agita durante 6 h a -78 °C. El crudo de reacción se trata con una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (10 mL) y se extrae con AcOEt (10 mL), los extractos orgánicos se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (AcOEt/hexano desde 5:95 hasta 10:90), obteniéndose el compuesto **32** como un aceite (0.67 g, 70 %).  $[\alpha]_D^{20} = -56.0$ . <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.22 – 8.04 (m, 2H, H-Ar), 7.66 (dt, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H, H-Ar), 7.48 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-Ar), 7.34 – 7.20 (m, 3H, H-Ar), 7.16 – 6.99 (m, 2H, H-Ar), 4.68 (m, 1H, CH), 4.15 – 3.90 (m, 3H), 3.28 (dd, *J*<sub>ab</sub> = 13.5, *J*<sub>a14</sub> = 7.0 Hz, 1H, H-16<sub>a</sub>), 3.14 (dd, *J*<sub>ab</sub> = 13.4, *J*<sub>a4</sub> = 3.4 Hz, 1H, H-6<sub>a</sub>), 2.76 (dd, *J*<sub>ba</sub> = 13.5, *J*<sub>b14</sub> = 7.6 Hz, 1H, H-16<sub>b</sub>), 2.62 (dd, *J*<sub>ba</sub> = 13.4, *J*<sub>b4</sub> = 9.4 Hz, 1H, H-6<sub>b</sub>), 1.21 (d, *J* = 6.7 Hz,

2H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 175.6 (CO), 153.0 (C-2), 148.3, 141.3, 139.6, 135.5, 134.9, 129.3 (2C), 128.9 (2C), 127.4, 124.1, 121.64, 66.1 (C-5), 55.2 (C-4), 39.5 (C-14), 39.2 (C-16), 37.8 (C-6), 16.6 (CH<sub>3</sub>). Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 15-95 % en 10.0 min, tr= 10.04 min, m/z [M+H]<sup>+</sup>= 368. Análisis elemental teórico C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C, 65.21; H, 5.47; N, 7.60; experimental C, 65.50; H, 5.71; N, 7.83.

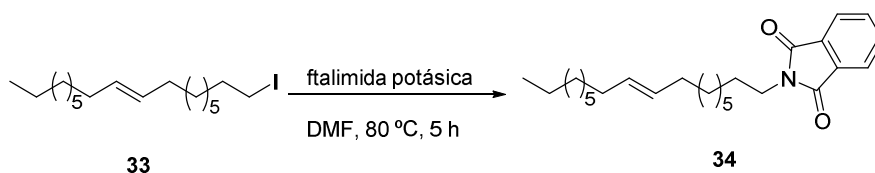
### Síntesis de (*E*)-iodooctadec-9-eno (**33**)



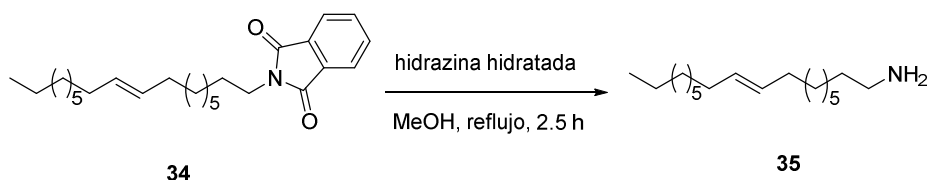
A una disolución de trifenilfosfina (0.30 g, 1.23 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) a 0 °C se adiciona imidazol (0.08 g, 1.23 mmol) y yodo (0.31 g, 1.23 mmol). A continuación, una disolución de *trans*-octadecen-9-ol (0.30 g, 1.18 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) se adiciona a la mezcla de reacción y se mantiene durante 3 h a t.a. El disolvente se elimina a presión reducida y al crudo de reacción se adiciona H<sub>2</sub>O (20 mL), y se extrae con AcOEt (20 mL). El extracto orgánico se seca sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro y el disolvente se elimina a presión reducida. Finalmente, el crudo se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (AcOEt/hexano desde 5:95 hasta 10:90), obteniéndose **33** como un sólido blanco (0.25 g, 58 %). P.f. 95 °C. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 5.42 – 5.34 (m, 2H, H-9,10), 3.25 – 3.10 (t, *J*= 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-I), 2.04 – 1.92 (m, 4H,

2CH<sub>2</sub>), 1.87 – 1.77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.47 – 1.19 (m, 22H, 11CH<sub>2</sub>), 0.93 – 0.80 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 130.4 (C-9), 130.2 (C-10), 33.5, 32.6, 32.5, 31.9, 30.5, 29.6, 29.5, 29.2, 29.0, 28.5, 22.7 (CH<sub>3</sub>), 14.1 (CH<sub>2</sub>-I).

### Síntesis de (*E*)-2-(octadec-9-en-1-il)isoindolina-1,3-diona (**34**)



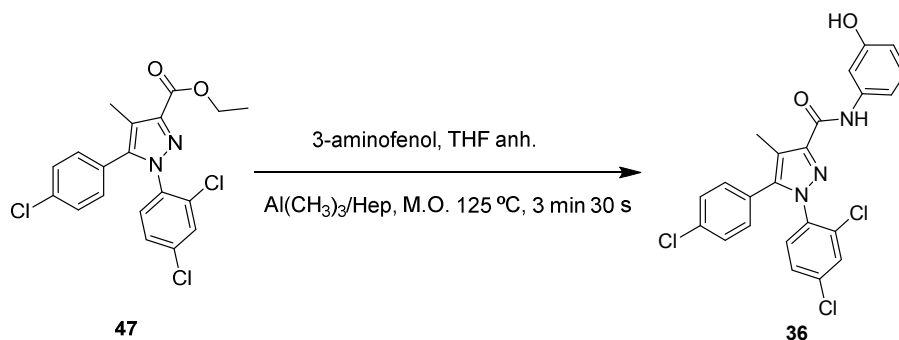
A una disolución de **33** (0.44 g, 1.12 mmol) en DMF se adiciona ftalimida potásica (0.10 g, 0.6 mmol) y la mezcla de reacción se mantiene a 80 °C durante 5 h. A continuación la mezcla de reacción se concentra y el residuo se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (AcOEt/hexano desde 5:95 hasta 10:90), obteniéndose **34** como un sólido blanco (0.14 g, 60 %). P.f. 97 °C. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.72 – 7.67 (m, 4H, H-Ar), 5.38 – 5.33 (m, 2H, H-9,10), 3.70 – 3.61 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-N), 2.00 – 1.89 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 1.70 – 1.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.36 – 1.20 (m, 22H, 11CH<sub>2</sub>), 0.89 – 0.82 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 168.4 (2CO), 133.8 (2CH-Ar), 132.2 (2C), 130.2 (C-9,10), 123.1 (2CH-Ar), 38.0 (CH<sub>2</sub>N), 32.6, 32.5, 31.9, 29.6, 29.6, 29.5, 29.3, 29.3, 29.1, 29.1, 29.0, 28.6, 26.8, 22.6 (CH<sub>2</sub>), 14.1 (CH<sub>3</sub>).

**Síntesis de (*E*)-octadec-9-en-1-amina (35)**

A una disolución de **34** (0.15 g, 0.38 mmol) en metanol (20 mL) se adiciona hidrazina hidratada (0.02 mL, 0.57 mmol) y la mezcla de reacción se mantiene a reflujo durante 2.5 h. A continuación, se adiciona HCl cc. (10 mL) y la mezcla de reacción se mantiene a reflujo durante 1.5 h. Transcurrido el tiempo de reacción la mezcla se filtra y el filtrado se ajusta a pH básico con una disolución alcalina de KOH 1 M. Seguidamente se extrae con dietiléter (20 mL), el extracto orgánico se seca sobre  $\text{MgSO}_4$  y el disolvente se elimina a presión reducida. Finalmente, el residuo se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  desde 0:100 hasta 10:90), obteniéndose **35** como un sólido blanco. (0.05 g, 42 %). P.f. 101 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 5.39 – 5.31 (m, 2H, H-9,10), 2.59 – 2.51 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NH}_2$ ), 1.99 – 1.86 (m, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 1.41 – 1.12 (m, 24H,  $12\text{CH}_2$ ), 0.89 – 0.77 (t,  $J = 6.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ (ppm) 130.5, 130.1 (C-9,10), 40.1 (C-1), 32.6, (C-8), 32.5 (C-11), 31.8 (C-16), 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 28.9, 26.5, 22.7, 14.1 ( $\text{CH}_3$ ).



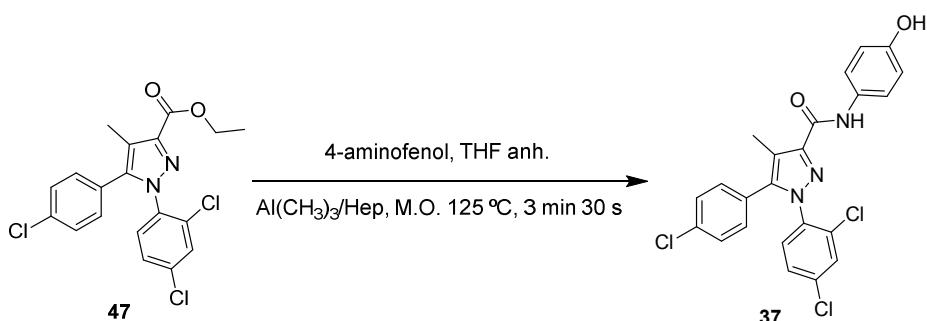
**Síntesis de 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-*N*-(3-hidroxifenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (**36**)**



A una disolución de 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxilato de etilo **47** (0.10 g, 0.24 mmol) y 3-aminofenol (0.06 g, 0.60 mmol) en THF (8 mL), se añade  $\text{Al(CH}_3)_3$  2.0 M en heptano (0.40 mL, 0.84 mmol) y la mezcla de reacción se calienta a 125 °C durante 3 min 30 s en el reactor de microondas. El crudo de reacción se enfría con un baño de hielo- $\text{H}_2\text{O}$  y se acidifica adicionando HCl 1 N gota a gota hasta que cesa la efervescencia. A continuación, se extrae con dietiléter (10 mL) y los extractos orgánicos se secan sobre  $\text{MgSO}_4$ . El disolvente se elimina a presión reducida y tras añadir unas gotas de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sobre el crudo de reacción el compuesto **36** precipita como un sólido blanco (0.84 g, 74 %). P.f. 130 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9.97 (s, 1H, NH), 9.34 (s, 1H, OH), 7.79 – 7.61 (m, 2H, H-Ar), 7.59 – 7.49 (m, 1H, H-Ar), 7.53 – 7.32 (m, 3H, H-Ar), 7.26 – 7.19 (m, 2H, H-Ar), 7.17 – 7.10 (m, 1H, H-Ar), 7.07 – 6.85 (m, 1H, H-Ar), 6.48 – 6.37 (m, 1H, H-Ar), 2.28 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 160.6 (CO), 157.4, 144.9, 142.8, 139.6, 135.6, 135.1, 133.8, 132.1, 132.0, 131.3 (2C), 129.6, 129.1, 128.7 (2C), 128.3, 127.1, 116.9, 111.2, 110.7, 107.5, 9.1 ( $\text{CH}_3$ ). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  10-100% en

10 min,  $t_r = 16.7$  min,  $m/z$   $[M+H]^+ = 474.4$ . Análisis elemental teórico  $C_{23}H_{16}Cl_3N_3O_2$ : C, 58.43; H, 3.41; N, 8.89; experimental C, 58.21; H, 3.31; N, 8.69.

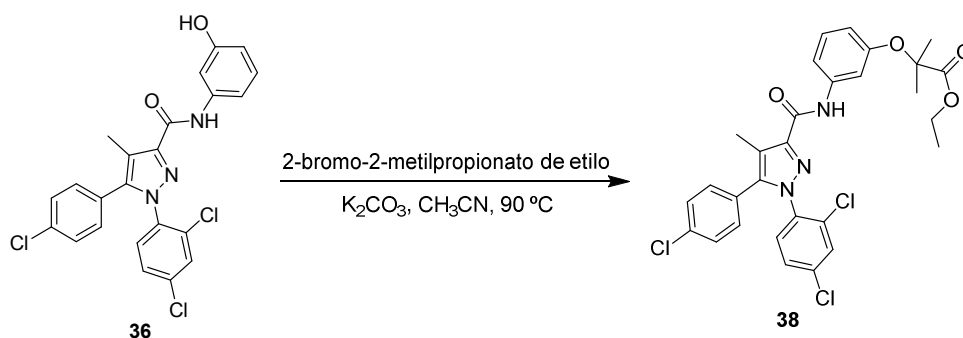
**Síntesis de 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-*N*-(4-hidroxifenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxiamida (37)**



A una disolución de 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxilato de etilo **47** (0.20 g, 0.48 mmol) y de 4-aminofenol (0.13 g, 1.20 mmol) en THF (10 mL) se añade  $Al(CH_3)_3$  2.0 M en heptano (0.80 mL, 1.68 mmol) y la mezcla se calienta en un reactor de microondas a 125 °C durante 3 min 30 s. El crudo de reacción se enfría con un baño de hielo- $H_2O$  y se acidifica añadiendo HCl 1 N gota a gota hasta el cese de la efervescencia. A continuación se extrae con dietiléter (10 mL), los extractos orgánicos se secan sobre  $MgSO_4$  y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyente  $CH_2Cl_2$  (100%), obteniéndose **37** como un sólido amarillo (0.12 g, 54 %). P.f. 120 °C.  $^1H$  RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.74 (s, 1H, NH), 7.49 – 7.37 (m, 3H, OH/H-Ar), 7.34 – 7.11 (m, 5H, H-Ar), 7.12 – 6.98 (m, 2H, H-Ar), 6.84 – 6.73 (m, 2H, H-Ar), 2.45 (s, 3H,  $CH_3$ ).  $^{13}C$  RMN (75

MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 160.7 (CO), 152.9, 144.8, 143.5, 139.2, 136.1, 135.8, 135.1, 133.0, 130.8 (2C), 130.5, 130.4, 130.3, 128.9 (2C), 127.9, 127.0, 122.3, 118.2, 115.8, 9.4 ( $\text{CH}_3$ ). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  10-100% en 10 min,  $t_r$  = 16.7 min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  = 474.4. Análisis Elemental teórico  $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_2$ : C, 58.43; H, 3.41; N, 8.89; experimental C, 58.27; H, 3.69; N, 8.75.

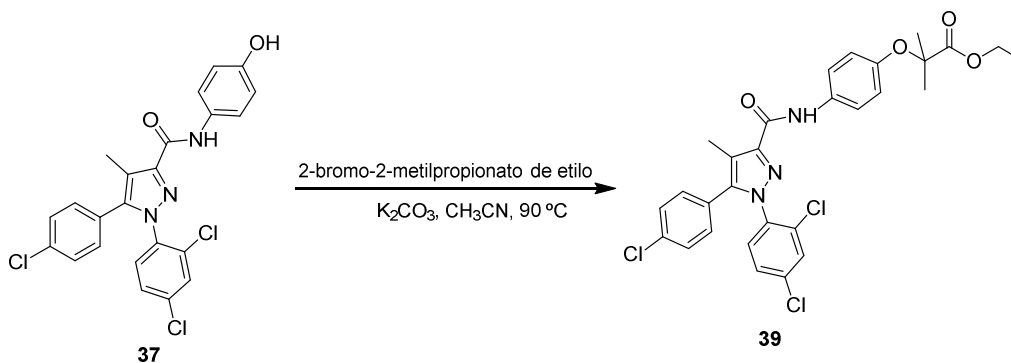
**Síntesis de 2-[3-(5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxiamido)fenoxi]-2-metilpropionato de etilo (38)**



Una suspensión de **36** (0.15 g, 0.31 mmol), 2-bromo-2-metilpropionato de etilo (0.30 mL, 1.86 mmol) y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1.20 g, 0.93 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  se calienta a reflujo durante 18 h. El disolvente se elimina a presión reducida, se adiciona  $\text{H}_2\text{O}$  (20 mL) y el crudo de reacción se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre  $\text{MgSO}_4$  y se elimina el disolvente. El crudo se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyentes ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  2 %) obteniéndose **38** como un sólido amarillo (0.15 g, 80 %). P.f. 140-142 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.68 (s, 1H, NH), 7.44 (m, 1H, H-Ar), 7.39 –

7.24 (m, 7H, H-Ar), 7.15 (m, 2H, H-Ar), 6.58 (m, 1H, H-Ar), 4.26 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.41 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.55 (s, 6H,  $2\text{CH}_3$ ), 1.27 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 173.2 (CO), 159.3 (CO), 155.0, 143.8, 142.4, 137.8, 135.1, 134.8, 134.0, 132.0, 129.8 (2C), 129.5, 129.4, 128.3, 127.9 (2C), 126.9, 126.0, 117.2, 113.5, 112.5, 110.1, 78.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 60.5 ( $\text{OCH}_2$ ), 24.4 ( $2\text{CH}_3$ ), 13.1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 8.5 ( $\text{CH}_3$ ). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  10-100% en 10 min,  $t_r = 18.9$  min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 588.1$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_4$ : C, 59.35; H, 4.47; N, 7.16; experimental C, 59.18; H: 4.35; N: 6.98.

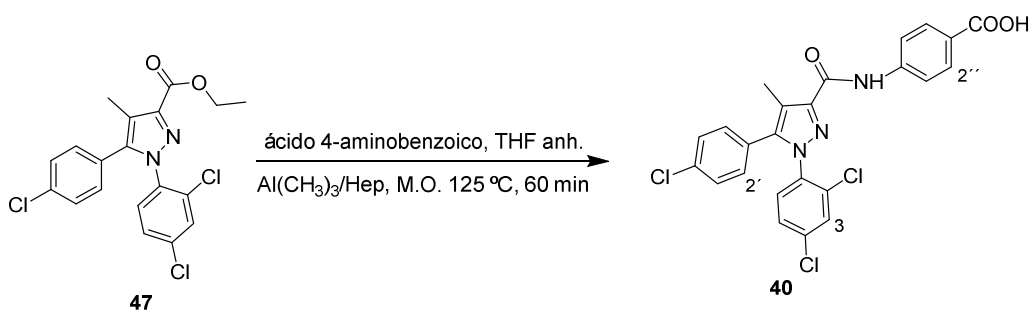
**Síntesis de 2-[4-(5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxiamido)fenoxi]-2-metilpropionato de etilo (39)**



Una suspensión de **37** (0.05 g, 0.09 mmol), 2-bromo-2-metilpropionato de etilo (0.09 mL, 0.55 mmol) y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.04 g, 0.27 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  se mantiene a reflujo durante 16 h. El disolvente se elimina a presión reducida, se adiciona  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) y el crudo de reacción se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre  $\text{MgSO}_4$  y el disolvente se elimina a presión reducida.

El crudo se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyentes ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  98:2) obteniéndose **39** como un sólido amarillo (0.05 g, 86 %). P.f. 184 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.62 (s, 1H, NH), 7.46 (m, 2H, H-Ar), 7.37 (m, 1H, H-Ar), 7.27 – 7.19 (m, 4H, H-Ar), 7.01 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H, H-3', 5'), 6.79 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H, H-2', 6'), 4.16 (c,  $J$  = 7.1 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.34 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.50 (s, 6H,  $2\text{CH}_3$ ), 1.19 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 174.1 (CO), 160.2 (CO), 152.0, 145.1, 143.5, 136.2, 136.1, 135.2, 133.2, 132.8, 130.9, 130.5, 130.4, 129.0 (2C), 127.9, 127.3, 120.8 (2C), 120.5, 118.3, 79.7 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 61.3 ( $\text{OCH}_2$ ), 25.4 ( $2\text{CH}_3$ ), 14.1 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 9.4 ( $\text{CH}_3$ ). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  10-100% en 10 min,  $t_r$  = 18.9 min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 588.1$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_4$ : C, 59.35; H, 4.47; N, 7.16; experimental C, 59.20; H, 4.37; N, 6.99.

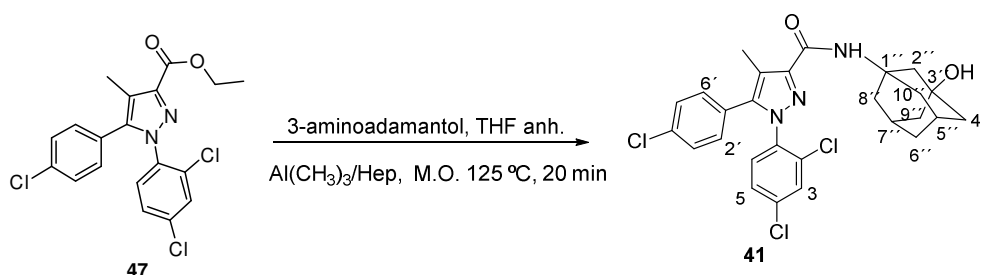
### Síntesis de ácido 4-(5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamido)benzoico (**40**)



A una disolución del compuesto **47** (0.05 g, 0.12 mmol) y ácido 4-aminobenzoico (0.04 g, 0.3 mmol) en THF (10 mL), se añade  $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$  2.0 M en heptano (0.2

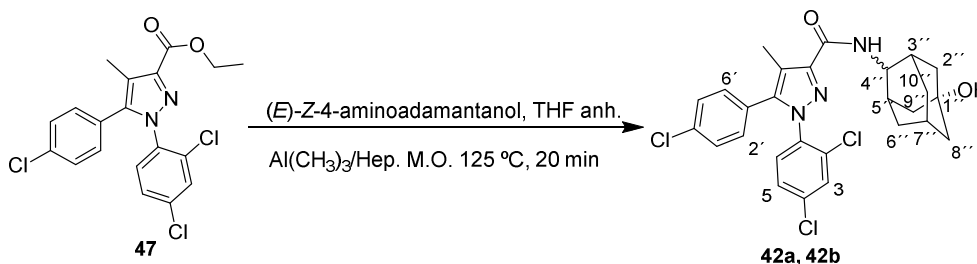
mL, 0.3 mmol) y la mezcla se calienta a 125 °C durante 60 min, en un reactor de microondas. El crudo de reacción se enfría con un baño de hielo-H<sub>2</sub>O y se acidifica con HCl 1 N añadiendo gota a gota hasta el cese de la efervescencia. A continuación se extrae con dietiléter (2x20 mL), los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (AcOEt/hexano desde 5:95 hasta 10:90), obteniéndose **40** como un sólido blanco (0.05 g, 90 %). P.f. 175 °C. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 10.49 (s, 1H, COOH), 7.97 (d, *J*= 8.9 Hz, 2H, H-2'', 6''), 7.89 (d, *J*= 8.9 Hz, 2H, H-3'', 5''), 7.81 (d, *J*= 8.5 Hz, 1H, H-6), 7.78 (d, *J*= 2.3 Hz, 1H, H-3), 7.60 (dd, *J*= 8.5, 2.3 Hz, 1H, H-5), 7.46 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H, H-3', 5'), 7.26 (d, *J*= 8.4 Hz, 2H, H-2', 6'), 2.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 167.3 (COOH), 161.4 (CONH), 144.9, 143.3, 143.2, 136.0, 135.6, 134.3, 132.5, 132.4, 131.7 (2C), 130.5 (2C), 130.0, 129.2 (2C), 128.7, 127.3, 125.8, 120.0 (2C), 117.6, 9.6 (CH<sub>3</sub>). Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 40-95 % en 10 min, tr= 8.07 min, m/z [M+H]<sup>+</sup>= 502. Análisis elemental teórico C<sub>24</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 57.57; H, 3.22; N, 8.39; experimental C, 57.20; H, 3.37; N, 8.59.

**Síntesis de 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-*N*[(1*r*,3*s*,5*R*,7*S*)-3-hidroxiadamantan-1-il]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (**41**)**



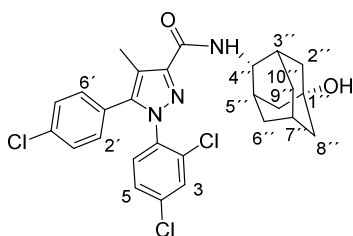
A una disolución de **47** (0.20 g, 0.49 mmol) y 3-aminoadamantol (0.12 g, 0.73 mmol) en THF (10 mL) se añade  $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$  2.0 M en heptano (0.49 mL, 0.98 mmol), la mezcla se calienta a 125 °C durante 20 min en un reactor de microondas. El crudo de reacción se enfría con un baño de hielo- $\text{H}_2\text{O}$  y se acidifica con HCl 1 N gota a gota hasta el cese de la efervescencia. A continuación se extrae con dietiléter (2x20 mL), los extractos orgánicos se secan sobre  $\text{MgSO}_4$  y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage ( $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  desde 0:100 hasta 4:96), obteniéndose **41** como un sólido blanco (0.13 g, 50 %). P.f. 170 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.42-7.40 (m, 1H, H-3), 7.35 – 7.21 (m, 4H, H-Ar), 7.04 – 6.84 (m, 2H, H-Ar), 6.79 (s, 1H, NH), 2.35 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.33 – 2.26 (m, 2H, H-5'',7''), 2.14 – 2.11 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.10 – 2.01 (m, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ), 1.76 – 1.67 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.63 – 1.51 (m, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 162.0 (CO), 145.4, 143.1, 135.9, 134.8, 132.9, 130.8 (C-2',6'), 130.5 (C-3), 130.3 (C-6), 128.8 (C-3',5'), 127.8 (C-5), 127.2, 117.6, 69.2 (C-1''), 54.2 (C-3''), 49.2 (C-8''), 44.1 (C-4''), 40.3 (C-2'',6''), 34.9 (C-6'',10''), 30.7 (C-5'',7''), 9.5 ( $\text{CH}_3$ ). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  40-95% en 10 min,  $t_r$  = 8.30 min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  = 532. Análisis elemental teórico  $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_2$ : C, 61.09; H, 4.94; N, 7.92; experimental C, 61.10; H, 4.84; N, 7.80.

**Síntesis de (*E*)-Z-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-N-[(1R,3S,5s,7s)-5-hidroxiadamantan-2-il]-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida (42a, 42b)**



A una disolución de **47** (0.150 g, 0.36 mmol) y (*E*)-Z-4-aminoadamantol (0.09 g, 0.54 mmol) en THF (10 mL), se añade  $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$  2.0 M en heptano (0.36 mL, 0.72 mmol) y la mezcla se calienta a 125 °C durante 20 min en un reactor de microondas. El crudo de reacción se enfría con un baño de hielo- $\text{H}_2\text{O}$  y se acidifica con HCl 1 N. A continuación se extrae con dietiléter (20 mL), los extractos orgánicos se secan sobre  $\text{MgSO}_4$  y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage ( $\text{AcOEt}$ /hexano desde 5:95 hasta 10:90).

**Isómero Z (42a)**



**42a** como un sólido blanco (0.11 g, 40 %). P.f. 265

°C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 7.76-7.72

(m, 2H, H-3,6), 7.57 (dd,  $J = 8.5, 2.3$  Hz, 1H, H-5),

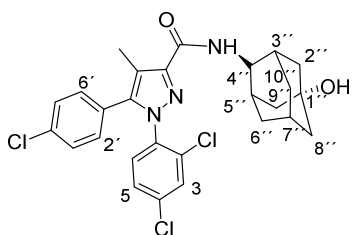
7.45 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-3',5'), 7.37 (d,  $J = 7.5$  Hz,

1H, NH), 7.21 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H, H-2',6'), 4.45 (s, 1H, OH), 3.89 (d,  $J = 7.4$  Hz,



1H, CHN), 2.23 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.13 (sa, 2H, H-3'',5''), 2.02 (sa, 1H, H-7''), 1.77 – 1.53 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub>), 1.44 (sa, 2H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 161.0 (CO), 144.6, 142.7, 135.6, 135.0, 133.7, 131.9, 131.8 (C-6), 131.2 (C-2',6'), 129.6 (C-3), 128.7 (C-3',5'), 128.3 (C-5), 127.1, 116.2, 65.3 (C-1''), 51.3 (C-4''), 44.9 (C-8''), 44.6 (C-6'',10''), 35.4 (C-2'',9''), 34.1 (C-5'',3''), 29.0 (C-7''), 9.0 (CH<sub>3</sub>). Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 60-95% en 10 min, tr= 4.9 min, m/z [M+H]<sup>+</sup>= 531. Análisis elemental teórico C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: C, 61.09; H, 4.94; N, 7.92; experimental C, 61.12; H, 4.65; N, 8.01.

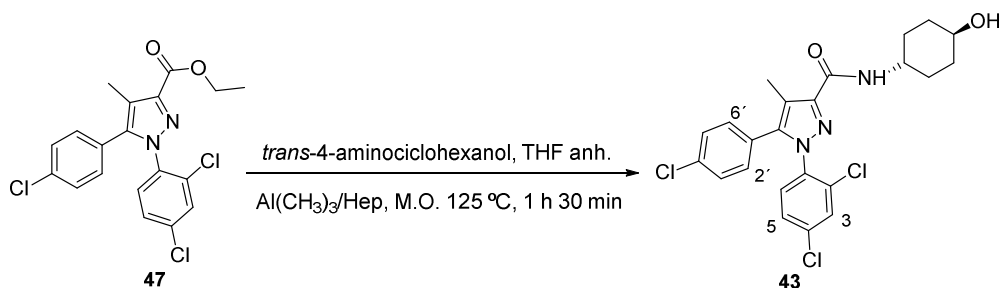
### Isómero *E* (42b)



**42b** como un sólido blanco (017 g, 60 %). P.f. 259

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 7.77 – 7.73 (m, 2H, H-3,6), 7.58 (dd, *J* = 8.5, 2.3 Hz, 1H, H-5), 7.46 (d, *J* = 8.6, 2H, H-3',5'), 7.22 (d, *J* = 8.5, 2H, H-2',6'), 4.46 (s, 1H, OH), 3.98 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, CHNH), 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.09 (sa, 2H, H-3'',5''), 1.99 (sa, 1H, H-7'') 1.70 – 1.55 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub>), 1.40 – 1.37 (m, 2H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 161.7 (CO), 145.2, 143.0, 136.1, 135.4, 134.1, 132.3, 132.2 (C-6), 131.6 (C-2',6'), 130.0 (C-3), 129.1 (C-3',5'), 128.8 (C-5), 127.6, 116.6, 65.8 (C-1''), 52.4 (C-4''), 45.5 (C-8''), 44.7 (C-6'',10''), 33.6 (C-3'',5''), 30.6 (C-2'',9''), 29.4 (C-7''), 9.4 (CH<sub>3</sub>). Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 60-95% en 10 min, tr= 5.1 min, m/z [M+H]<sup>+</sup>= 531. Análisis elemental teórico C<sub>27</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: C, 61.09; H, 4.94; N, 7.92; experimental C, 61.02; H, 4.91; N, 7.97.

**Síntesis de 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-*N*-[(1*R*,4*R*)-4-hidroxiciclohexil]-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (**43**)**

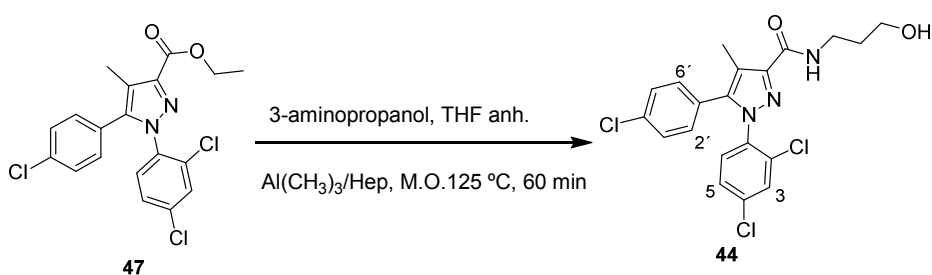


A una disolución de **47** (0.10 g, 0.24 mmol) y *trans*-4-aminociclohexanol (0.07 g, 0.61 mmol) en THF (10 mL), se añade  $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$  2.0 M en heptano (0.3 mL, 0.61 mmol) y la mezcla se calienta a 125 °C durante 1 h 30 min en un reactor de microondas. El crudo de reacción se enfría con un baño de hielo- $\text{H}_2\text{O}$  y se acidifica con HCl 1 N añadiendo gota a gota hasta el cese de la efervescencia. A continuación se extrae con dietiléter (20 mL), los extractos orgánicos se secan sobre  $\text{MgSO}_4$  y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage ( $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  desde 0:100 hasta 10:90), obteniéndose **43** como un sólido amarillo (0.03 g, 30 %). P.f. 188 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.40 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, H-3), 7.30 – 7.23 (m, 4H, H-Ar), 7.03 (m, 2H, H-Ar), 6.75 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, NH), 3.92 – 3.80 (m, 1H,  $\underline{\text{CH}}$ -NH), 3.61 – 3.51 (m, 1H,  $\underline{\text{CH}}$ -OH), 2.34 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.15 – 1.97 (m, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 1.72 (s, 1H, OH), 1.49 – 1.21 (m, 4H,  $2\text{CH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 162.5 (CO), 145.4, 143.5, 136.4, 136.3, 135.3, 133.4, 131.2 (2C), 131.0, 130.8 (C-3), 129.3 (2C), 128.3, 127.6, 118.2, 70.3 (CH-OH), 47.7 (CH-NH), 34.5 ( $2\text{CH}_2$ ), 31.3 ( $2\text{CH}_2$ ), 9.9 ( $\text{CH}_3$ ).

Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 40-95 % en 10 min, tr= 6.44 min, m/z [M+H]<sup>+</sup>= 479.

Análisis elemental teórico C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: C, 57.70; H, 4.63; N, 8.78; experimental C, 57.82; H, 4.32; N, 8.50.

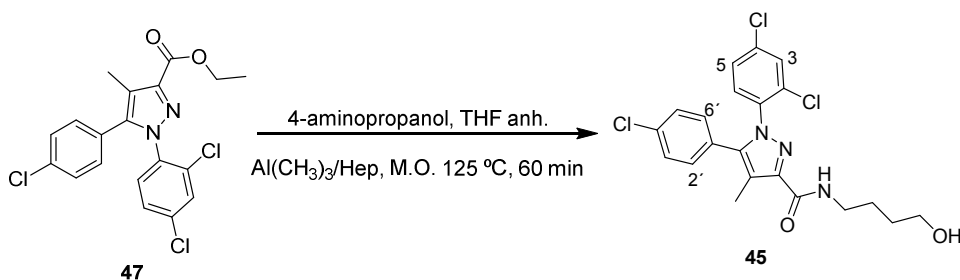
**Síntesis de 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-N-(3-hidroxipropil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida (44)**



A una disolución de **47** (0.20 g, 0.49 mmol) y 3-aminopropanol (0.07 g, 0.98 mmol) en THF (10 mL), se añade Al(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 2.0 M en heptano (0.5 mL, 0.98 mmol) y la mezcla se calienta a 125 °C durante 60 min, en un reactor de microondas. El crudo de reacción se enfría con un baño de hielo-H<sub>2</sub>O y se acidifica con HCl (1 N) añadiendo gota a gota hasta el cese de la efervescencia. A continuación, se extrae con dietiléter (2x20 mL) y los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub>. El disolvente se elimina a presión reducida y el crudo de reacción se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (AcOEt/hexano desde 5:95 hasta 10:90), obteniéndose **44** como un sólido amarillento (0.09 g, 40 %). P.f. 150 °C. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.40 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-3), 7.32 – 7.11 (m, 5H, 4H-Ar/NH), 7.04 – 6.90 (m, 2H, H-Ar), 3.66 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 3.56 – 3.46 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 3.02 (s, 1H,

OH), 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.75 – 1.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 163.9 (CO), 144.6, 143.1, 136.0, 135.8 134.9, 132.9, 130.8 (2C), 130.4, 130.3, 128.9 (2C), 127.9, 127.1, 117.8, 58.9 (CH<sub>2</sub>OH), 35.3 (CH<sub>2</sub>NH), 32.6 (CH<sub>2</sub>), 9.40 (CH<sub>3</sub>). Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 15-95% en 10 min, tr= 9.97 min, m/z [M+H]<sup>+</sup>= 438. Análisis elemental teórico C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: C, 54.75; H, 4.14; N, 9.58; experimental C, 54.48; H, 4.51; N, 9.60.

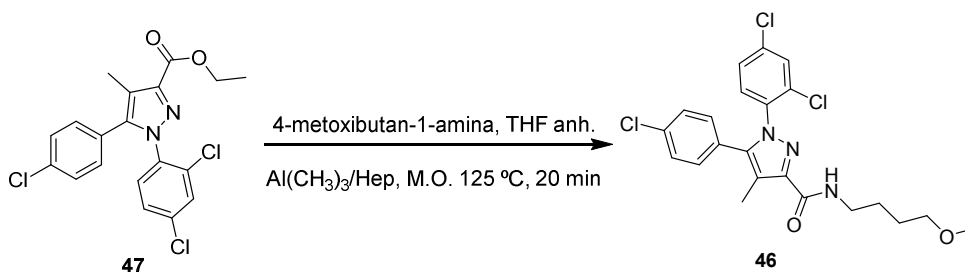
**Síntesis de 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-N-(4-hidroxibutil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida (45)**



A una disolución de **47** (0.20 g, 0.49 mmol) y 4-aminobutanol (0.09 g, 0.98 mmol) en THF (10 mL), se añade Al(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 2.0 M en heptano (0.5 mL, 0.98 mmol) y la mezcla se calienta a 125 °C durante 60 min en un reactor de microondas. El crudo de reacción se enfría con un baño de hielo-H<sub>2</sub>O y se acidifica con HCl (1 N) añadiendo gota a gota hasta el cese de la efervescencia. A continuación se extrae con dietiléter (2x20 mL), los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (AcOEt/hexano desde 5:95 hasta 10:90), obteniéndose **45** como un sólido

blanco. (0.11 g, 45 %). P.f. 131 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.39 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H, H-3), 7.32 – 7.22 (m, 5H, 4H-Ar/NH), 7.04 – 6.93 (m, 2H, H-Ar), 3.64 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.42 – 3.30 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 2.64 (s, 1H, OH), 2.33 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.75 – 1.54 (m, 4H, 2 $\text{CH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 162.7 (CO), 144.9, 142.9, 135.82, 135.76, 134.8, 132.8, 130.7 (2C) 130.4, 130.2 (C-3), 128.7 (2C), 127.8, 127.1, 117.6, 62.1 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 38.6 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 29.7 ( $\text{CH}_2$ ), 26.1 ( $\text{CH}_2$ ), 9.28 ( $\text{CH}_3$ ). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  15-95% en 10 min,  $t_r = 10.01$  min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 453$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_2$ : C, 55.71; H, 4.45; N, 9.28; experimental C, 55.68; H, 4.39; N, 9.41.

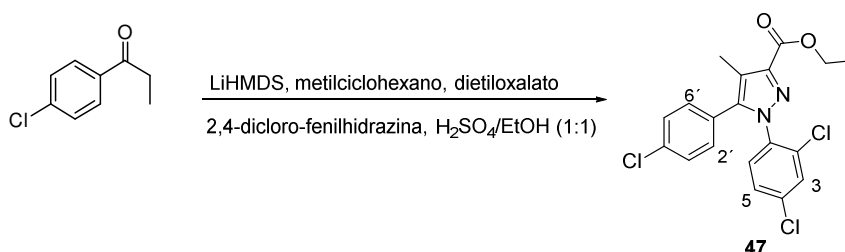
**Síntesis de 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-*N*-(4-metoxibutil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (46)**



A una disolución de **47** (0.20 g, 0.49 mmol) y 4-metoxibutan-1-amina (0.10 g, 0.98 mmol) en THF (10 mL), se añade  $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$  2.0 M en heptano (0.5 mL, 0.98 mmol) y la mezcla se calienta, en un reactor de microondas, a 125 °C durante 20 min. El crudo de reacción se enfría con un baño de hielo- $\text{H}_2\text{O}$ , y se acidifica con HCl 1 N añadiéndolo gota a gota hasta el cese de la efervescencia. A continuación se extrae con dietiléter (2x20 mL), los extractos orgánicos se secan

sobre  $\text{MgSO}_4$  y el disolvente se elimina a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash automatizada en sílica gel en sistema Biotage (AcOEt/hexano desde 5:95 hasta 10:90), obteniéndose **46** como un aceite amarillo (0.11 g, 50 %).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.45-7.35 (m, 1H, H-Ar), 7.37 – 7.22 (m, 5H, H-Ar/NH), 7.18 – 7.03 (m, 2H, H-Ar), 3.67 – 3.46 (m, 4H), 3.36 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.40 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.91 (q,  $J = 6.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 162.6 (CO), 145.0, 142.8, 135.9, 135.8, 134.8, 132.8, 130.8 (2C), 130.4, 130.3, 128.8 (2C), 127.9, 70.9 ( $\text{CH}_2$ ), 58.6 ( $\text{OCH}_3$ ), 36.8 ( $\text{CH}_2$ ), 29.4 ( $\text{CH}_2$ ), 9.3 ( $\text{CH}_3$ ). Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  60-95% en 10 min,  $t_r = 4.60$  min,  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 452$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_2$ : C, 56.61; H, 4.75; N, 9.00; experimental C, 56.68; H, 4.49; N, 9.41.

### Síntesis de 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxilato de etilo (**47**)



Sobre una disolución de LiHMDS 1.0 M en hexano (24 mL, 0.08 mmol) a 0 °C y bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  se adiciona lentamente una disolución de cloropropiofenona (4.0 g, 0.02 mmol) en metilciclohexano (20 mL) y la mezcla de reacción se agita durante 2.5 h a temperatura ambiente. A continuación, la reacción se mantiene a 0 °C y se adiciona dietiloxalato (3.53 mL, 0.09 mmol)

durante 15 min. La mezcla de reacción se agita durante 18 h a temperatura ambiente. El sólido blanco precipitado se filtra y se lava sucesivamente con hexano (3x100 mL), ciclohexano (2x100 mL) y metilciclohexano (1x100 mL) y se seca a vacío durante 3 h obteniéndose el enolato de litio de 2,4-dioxo-3-metil-4-(4-clorofenil)butanoato de etilo. A una disolución de dicha sal (1.60 g, 6.83 mmol) en una mezcla EtOH:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:1) (20 mL) se adiciona hidrocloreuro de 2,4-diclorofenilhidrazina (0.73 g, 6.38 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo de EtOH durante 12 h, el disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se neutraliza con NaOH 1 N y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los extractos orgánicos se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El crudo se purifica por cromatografía en columna utilizando como eluyentes (Hexano/Acetato de etilo 1:3), obteniéndose **47** como un sólido amarillo (0.5 g, 24 %). P.f. 126 °C. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 7.40-7.13 (m, 5H, H-Ar), 7.02 (d, *J*= 9.5Hz, 2H, H-2',6'), 4.38 (c, *J*=7.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.36 (t, *J*=7.1 Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 162.8, 143.0, 142.9, 136.1, 136.0, 135.0, 133.1, 130.9, 130.7, 130.1, 128.9, 127.8, 127.1, 126.5, 119.2, 61.0, 14.4, 9.7. Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 10-100% en 10 min, tr= 6.19 min, m/z [M+H]<sup>+</sup>= 411.3. Análisis elemental teórico C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: C, 55.70; H, 3.69; N, 6.84; experimental C, 55.59; H, 3.81; N, 6.94.

**PARTE EXPERIMENTAL FARMACOLÓGICA****Ensayos de desplazamiento de radioligando en muestras de córtex frontal humano *posmortem***

Las membranas de células transfectadas con los receptores humanos CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (RBHCB1M400UA y RBXCB2M400UA) fueron suministradas por Perkin-Elmer Life y Analytical Sciences (Boston, MA). La concentración de las membranas del receptor CB<sub>1</sub> utilizado fue 2,33 pmol/mg o 3,60 pmol/mg dependiendo del lote comercial. La concentración proteica en el ensayo fue de 8,0 mg/ml. En el caso del receptor CB<sub>2</sub> la concentración fue de 5,20 pmol/mg o 6,20 pmol/mg según el lote. La concentración de proteína en cada ensayo fue de 4.0 mg/ml. La membrana comercial se diluyó (1:20) con la correspondiente disolución tampón (50 mM TrisCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, 2,5 mM EDTA, 0,5 mg/mL BSA y pH = 7,4 para CB<sub>1</sub>; 50 mM TrisCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, 2,5 mM EGTA, 1 mg/mL BSA y pH = 7,5 para CB<sub>2</sub>). El radioligando empleado fue [<sup>3</sup>H]-CP55940 (PerkinElmer) a una concentración de  $K_D \times 0,8$  nM (siendo  $K_D$  la constante de la membrana empleada). El volumen final fue de 200 µL para los ensayos de *binding* de CB<sub>1</sub> y 600 µL para CB<sub>2</sub>. Se utilizaron placas de 96 pocillos previamente siliconizadas para la realización del experimento.

Las membranas fueron resuspendidas en el correspondiente tampón e incubadas con el radioligando y cada compuesto ( $10^{-4}$ - $10^{-11}$  M) durante 90 minutos a 30 °C. Las uniones no específicas fueron determinadas con 10 µM de WIN55212-2. La unión del 100 % de radioligando a la membrana fue comprobada mediante su incubación con la membrana sin añadir compuesto. La



filtración se llevó a cabo con un equipo FiltermateHarvester® (Perkin-Elmer) y filtros Filtermat A GF/C pretratados con polietilenimina al 0.05%. Tras el filtrado, se lava nueve veces el filtro con el tampón correspondiente, se seca y se fusiona con líquido de centelleo (Meltilex™ A, Perkin Elmer). Tras ello, se cuantifica la radioactividad mediante un espectrofotómetro de líquido de centelleo (Wallac MicroBeta Trilux, Perkin-Elmer). Los datos del ensayo de competición fueron analizados usando el programa GraphPad Prism, los valores de  $K_i$  se expresan como la media de los valores obtenidos  $\pm$  el error estándar de la media (E.E.M.) de al menos tres experimentos llevados a cabo por triplicado para cada punto.

### **Ensayos *in vitro* en tejido deferente de ratón aislado**

Se usaron ratones macho ICR, cuyos conductos deferentes se aislaron según la técnica descrita por Hughes, y se montaron en un baño de órganos. Se sometieron a periodos alternos de estimulación eléctrica (trenes de 5 pulsos rectangulares de 70 V, 15 Hz y 2 ms de duración cada uno, que se aplican a cada minuto) y de descanso (10 min). La fuerza isométrica se monitorizó utilizando un sistema de registro y análisis de datos MacLab.

1. Actividad agonista: El efecto agonista de los nuevos compuestos se evaluó realizando curvas concentración-respuesta no acumulativas ( $10^{-7}$ – $2 \times 10^{-5}$  M). Su efecto se comparó con el del agonista cannabinoide sintético no selectivo CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> WIN55212-2.

2. Actividad antagonista: Para llevar a cabo estos ensayos, el efecto del agonista cannabinoide WIN55212-2, se evaluó tras la incubación con los compuestos en

una concentración de  $10^{-6}$  M. Se realizaron curvas concentración-respuesta no acumulativas del agonista de referencia, y el efecto de los nuevos compuestos se comparó con el efecto antagonista ejercido por AM251, cannabinoide selectivo del receptor CB1. Para los compuestos que presentaron un perfil antagonista más interesante, se evaluó el efecto del agonista cannabinoide WIN 55,212-2, tras la incubación con dos concentraciones distintas ( $2 \times 10^{-6}$  y  $10^{-6}$ ) de dichos compuestos.

#### **Transfección celular y ensayo del gen indicador de luciferasa (reporter gene assay)**

El ensayo "reporter gene assay" es un método in vitro utilizado para determinar y cuantificar la existencia de interacciones físicas entre proteínas, siendo útil para confirmar en nuestro caso la interacción del factor de transcripción PPAR-alfa y el coactivador SRC-1 en células MCF-7. La oleiletanolamida fue usada como un control positivo y la anandamida como control negativo.

Oleiletanolamida (OEA), GW7647, anandamida (AEA) y ácido oleico fueron suministrados por TocrisBioscience (CooksonLtd. Bristol, UK). Para los experimentos in vitro, con cultivo de células todos los compuestos fueron disueltos y diluidos en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma AldrichSpain).

Constructos de DNA: Como vehículo de expresión del ADNc para el receptor PPAR- $\alpha$  humano se utilizó el vector de expresión eucariota pSG5 (4100 pares de bases, Stratagene Co.). Esta construcción se utilizó para la sobreexpresión in vivo de la proteína en células mamíferas.

Cuatro copias del gen CPTI humano tipo DR1 RE (secuencia GTAGGGAAAAGGTCA) fueron individualmente fusionadas con el promotor de la timidina quinasa en el vector pGL-2 Basic (5598 pares de bases, Promega Co.) que carece de promotor eucariota y que contiene un gen indicador (traducción de reporter gene) luciferasa de luciérnaga (*Photinuspyralis*). Este vector es muy utilizado en el análisis cuantitativo de factores capaces de regular la expresión de genes en células mamíferas. Este vector pGL-2 Basic también presenta una región de resistencia a la ampicilina (gen para  $\beta$ -lactamasa).

Células humanas de cáncer de mama MCF-7 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos (105 células/mL) y crecidas durante toda la noche para su estabilización en un medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) libre de rojo fenol suplementado con un 5 % de suero bovino fetal o FBS tratado con carbón.

Liposomas conteniendo plásmidos de DNA fueron formados incubando 1  $\mu$ g de un vector de expresión para PPAR-alfa, RXR-alfa y SRC-1 salvaje y 1  $\mu$ g de plásmido indicador luciferasa con 10  $\mu$ g de *N*-[1-(2,3-dioleoiloxi)propil]-*N,N,N*-trimetilamonio metilsulfato (DOTAP, Roche) durante 15 minutos a temperatura ambiente en un volumen total de 100  $\mu$ L. Después de dilución con 900  $\mu$ L de DMEM libre de rojo fenol, los liposomas fueron añadidos a las células. El DMEM libre de rojo fenol suplementado con 500  $\mu$ L de FBS tratado con carbon al 15 % fue añadido 4 h después de la transfección. En este momento, las células fueron tratadas 16 horas con diferentes concentraciones en DMSO (10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-4</sup> M) de OEA, GW7647, AEA, ácido oleico y los diferentes compuestos sobre evaluación como indicado.

Las células fueron lisadas 15 horas después de la estimulación usando la solución reguladora de pH de lisis del gen indicador siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics).

El ensayo de quimioluminiscencia que permite una determinación cuantitativa de actividad luciferasa en células transfectadas se llevó a cabo siguiendo también las indicaciones del proveedor (Luciferase Reporter Gene Assay, constant light signal de Roche DiagnosticsGmbH): La presencia de esta enzima es detectable en extractos de células transfectadas gracias a su bioluminiscencia: la reacción catalizada por la luciferasa transforma la luciferina en oxiluciferina en presencia de ATP,  $Mg^{2+}$  y  $O_2$ , y produce además fotones de luz visible.

La actividad luciferasa fue normalizada respecto a la concentración de proteína (obtenida previamente siguiendo el método de Bradford con el kit reactivo Quick Start Bradford ProteinAssay Kit 1x suministrado comercialmente por Bio-Rad Laboratories Inc. y empleando un lector de microplacasVERSAmax® de Molecular Devices Corp.), y los factores de inducción se calcularon como la ratio de actividad luciferasa de las células estimuladas por ligando respecto a los solventes.

### **Estudios de ingesta de comida: tratamiento agudo**

Se han empleado ratas (*RattusNorvegicus*) albinas macho de la cepa Wistar procedentes de Charles RiversLaboratories España, S.A. (Barcelona, Spain), cuyos pesos oscilaron entre 300-350 g al inicio de los experimentos. Los animales fueron enjaulados individualmente, en condiciones de temperatura (22 °C) y humedad (55 %) controladas bajo un ciclo luz/oscuridad de 12 horas (luz

apagada de 8:00-20:00 h). Los mismos tuvieron acceso libre a comida y agua en sus correspondientes jaulas. Todos los entrenamientos y sesiones experimentales fueron efectuados a partir de las 20:00 h.

Todos los fármacos fueron preparados en fresco en una solución compuesta por Tween-80 al 5 % en suero fisiológico estéril. Las diferentes dosis fueron preparadas en viales distintos de modo que tras pesar la cantidad de compuesto necesaria, se añadía Tween-80. El compuesto, con su correspondiente volumen de tensoactivo, era sonicado y homogeneizado (con ayuda de un imán de agitación) durante 15-30 min. A continuación se añadía lentamente el volumen necesario de suero hasta completar la solución.

Los compuestos fueron administrados vía intraperitoneal (i.p.) de forma aguda en un volumen de administración de 1 mL por kg de animal.

# Capítulo 2

Un aspecto importante a tener en cuenta en el diseño de nuevos fármacos es lo que se refiere a la solubilidad y forma de administración de los mismos. Mas del 50% de los fármacos comercializados son sales orgánicas mayoritariamente sales cristalinas sólidas en las que el catión mas abundante es el sodio, mientras que el anión mas corriente es el cloruro. Ahora bien existen problemas asociados al empleo de estos sólidos cristalinos, fundamentalmente la existencia de polimorfismo, y en ocasiones la baja solubilidad y biodisponibilidad, por lo que se buscan alternativas nuevas como los solvatos, co-cristales etc. La transformación de estas sales en líquidos iónicos está avanzando posiciones dentro del mundo farmacéutico como alternativa al diseño y optimización de fármacos. Estos líquidos iónicos pueden suponer nuevas vias de administración y patentabilidad de los fármacos incluidos en estas combinaciones.

Los líquidos iónicos (ILs, Ionic liquids) son sales con puntos de fusión en general menores de 100°C. La flexibilidad en su diseño permite desde mejorar la solubilidad de fármacos comercializados hasta sumar dos principios activos (APIs, active pharmaceutical ingredients) logrando una doble funcionalidad. Esta aproximación aún siendo diferente, está relacionada con el diseño de ligandos múltiples a los que ya se ha hecho referencia en esta memoria

Asi pues , en este capítulo se describe la síntesis y caracterización de líquidos iónicos pertenecientes al grupo de anestésicos, antiinflamatorios, emolientes y edulcorantes. Uno de los cationes utilizados es la metformina, fármaco que se emplea para tratar la hiperglucemia, uno de los factores causante del síndrome metabólico. La evaluación farmacológica preliminar de estos líquidos iónicos basados en principios activos (ILs-APIs) ha empezado con un derivado de metformina, del que se ha estudiado su efecto sobre la glucosa.

## 2.1. INTRODUCCIÓN

### 2.1.1. LIQUIDOS IONICOS: ORIGEN Y EVOLUCION

Los líquidos iónicos (ILs, en sus iniciales inglesas) se definen como sales orgánicas con puntos de fusión generalmente por debajo de 100 °C siendo en algunas ocasiones líquidos a temperatura ambiente.<sup>72</sup> En los últimos años han suscitado gran interés, y así lo reflejan los más de 7600 artículos publicados en 2012 mostrando una amplia variedad de aplicaciones nuevas de ILs (Scifinder<sup>TM</sup>).

En lo que se refiere a la nomenclatura, cuando se trata de sales cuaternarias no hay problema, por ejemplo, 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato. Sin embargo, cuando el líquido iónico corresponde a un compuesto formado por un ácido y una base de Brønsted, la nomenclatura difiere según que la transferencia de protón tenga lugar (sal) o no (complejo). Así, en un caso, será un cloruro de imidazolio y en el otro un complejo imidazol-cloruro de hidrógeno. A priori no es posible saber que estructura tiene el producto y, por lo tanto, la nomenclatura es bastante arbitraria. A esto se une el problema de los principios activos cuyo nombre no se presta a aplicar las reglas de la IUPAC, como es el caso de la lidocaina (no se usa lidocainio). Por todas estas razones, la nomenclatura usada en este capítulo no es homogénea.

---

<sup>72</sup> Ferraz, R.; Branco, L. C.; Prudêncio, C.; Noronha, J. P.; Petrovski, Ž. *ChemMedChem* **2011**, 6, 975.

Los líquidos iónicos se han clasificado en tres generaciones en función de sus propiedades y características.<sup>73</sup> La primera generación está formada por los ILs con propiedades físicas únicas como una presión de vapor baja y alta estabilidad térmica. Estos evolucionaron a una segunda generación en la cual ya se consideraron las propiedades químicas e incluían ILs con uso potencial como materiales funcionalizados, por ejemplo materiales energéticos y lubricantes. En la actualidad ha aumentado el interés por su actividad biológica y toxicidad reducida siendo esta última una propiedad que se puede controlar en el diseño de ILs de tercera generación, mediante el uso de APIs (Active Pharmaceutical Ingredients) de toxicidad baja (Figura 34).

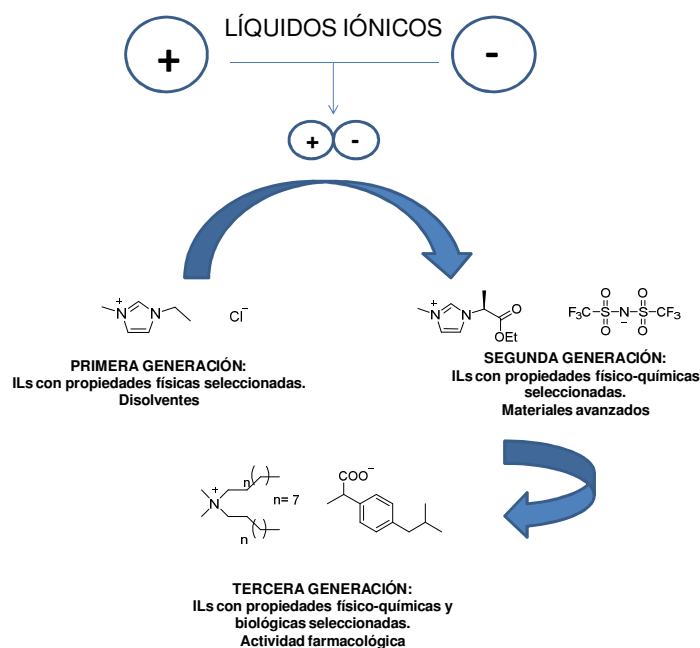


Figura 34. Evolución cronológica de los ILs.

<sup>73</sup> Hough, W. L.; Smiglak, M.; Rodríguez, H.; Swatloski, R. P.; Spear, S. K.; Daly, D. T.; Pernak, J.; Grisel, J. E.; Carliss, R. D.; Soutullo, M. D. *New Journal of Chemistry* **2007**, *31*, 1429.



El primer líquido iónico fue descrito a mediados del siglo XIX como un “aceite rojo” obteniéndose en el transcurso de la reacción Friedel-Crafts,<sup>74</sup> la estructura que se propuso de esta sal de heptaclorodialuminato está representada en la Figura 35. Décadas después se preparó el nitrato de etilamonio, [EtNH<sub>3</sub>][NO<sub>3</sub>], como el primer IL a temperatura ambiente. En 1963 la Academia de Aviación de Estados Unidos comenzó a interesarse por estos derivados como electrolitos para el desarrollo de baterías.

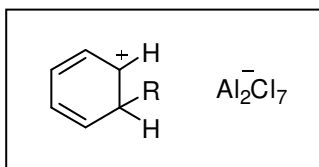


Figura 35. Estructura propuesta para el intermedio de la reacción Friedel-Crafts.

En química los ILs se utilizan también como una alternativa ecológica a los disolventes orgánicos tóxicos y volátiles. La alquilación de Friedel-Crafts fue la primera reacción orgánica catalizada por ILs y desde entonces, los ILs han sido utilizados como disolventes y como catalizadores<sup>75</sup> en una gran variedad de reacciones orgánicas.<sup>76</sup> Los ILs que son líquidos a temperatura ambiente se denominaron “disolventes diseñados” ya que era posible obtenerlos con propiedades determinadas.<sup>77</sup> Su uso fue extendido a otros campos y su

<sup>74</sup> Xie, Y.; Zhang, Z.; Jiang, T.; He, J.; Han, B.; Wu, T.; Ding, K. *Angewandte Chemie* **2007**, *119*, 7393.

<sup>75</sup> Welton, T. *Coordination Chemistry Reviews* **2004**, *248*, 2459.

<sup>76</sup> Giernoth, R. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 2834.

<sup>77</sup> Sowmiah, S.; Srinivasadesikan, V.; Tseng, M.-C.; Chu, Y.-H. *Molecules* **2009**, *14*, 3780.

desarrollo continúa por sus peculiares propiedades físico-químicas tales como su estabilidad térmica y electroquímica, alta conductividad iónica y baja volatilidad. Estas propiedades únicas han sido una ventaja para su aplicación como electrolitos para electroquímica, nanotecnología, etc.<sup>78,79</sup>

La primera generación de ILs usaba aluminatos como contraiones, pero estos derivados eran sensibles al aire e higroscópicos lo que suponía una desventaja para su manejo. Años más tarde, Wilkes y Zaworotko sintetizaron una serie de ILs basados en aniones más estables en agua y al aire como  $[\text{PF}_6]^-$ ,  $[\text{BF}_4]^-$  y  $[\text{CF}_3\text{CO}_2]^-$ , lo que dio lugar a la segunda generación de ILs.<sup>80</sup>

La mayor parte de los líquidos iónicos descritos en la bibliografía están constituidos por cationes de naturaleza orgánica, voluminosos, con poca simetría y aniones inorgánicos y orgánicos. La asimetría de los diferentes cationes se traduce en energías reticulares bajas, lo que podría justificar el punto de fusión por debajo de 100 °C. Los cationes más comunes son por ejemplo derivados de piridinio, imidazolio, pirrolidinio y amonio. En cuanto a los aniones, lo más utilizados son haluros, hexafluorofosfatos, tetrafluorboratos, alquilsulfatos, alquilsulfonatos y tosilato (Figura 36).

---

<sup>78</sup> Haumann, M.; Riisager, A. *Chemical Reviews* **2008**, 108, 1474.

<sup>79</sup> Han, X.; Armstrong, D. W. *Accounts of Chemical Research* **2007**, 40, 1079.

<sup>80</sup> Wilkes, J. S. *Green Chemistry* **2002**, 4, 73.

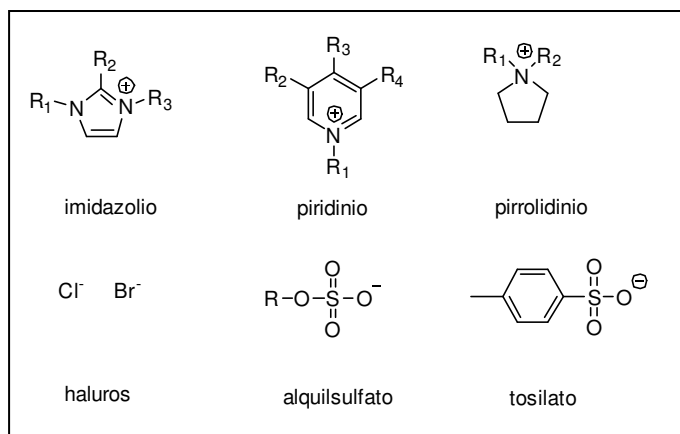


Figura 36. Cationes y aniones comúnmente utilizados en ILs.

La propiedad más importante e interesante de los ILs es la versatilidad que ofrecen para el diseño de propiedades físicas, químicas y biológicas mediante la modificación independiente de las propiedades del catión y el anión.

### 2.1.2. LÍQUIDOS IÓNICOS CON APLICACIONES TERAPÉUTICAS

Esta generación engloba ILs con propiedades biológicas o líquidos iónicos farmacológicamente activos.

Como ya se ha comentado aproximadamente el 50 % de los fármacos son administrados en forma de sal en las que el contraión utilizado puede determinar las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas del fármaco, por ejemplo la temperatura de fusión y la solubilidad.<sup>81,82</sup> Muchas de las formulaciones son abandonadas en fases avanzadas de su desarrollo como medicamentos debido a problemas derivados de la falta de conocimiento sobre su polimorfismo.

<sup>81</sup> Black, S. N.; Collier, E. A.; Davey, R. J.; Roberts, R. J. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2007**, 96, 1053.

<sup>82</sup> Galcera, J.; Molins, E. *Crystal Growth and Design* **2008**, 9, 327.

Además de ser un problema para el diseño de fármacos una de las consecuencias más graves de este fenómeno es convertir una dosis de fármaco eficaz en dosis letal por la alteración de la solubilidad. La investigación de las diferentes formas amorfas y cristalinas es un desafío constante y de gran interés para la industria farmacéutica ya que además se ha convertido en una de las estrategias utilizadas para extender la duración de las patentes.

Por ejemplo, la estructura cristalina del antiepiléptico Carbamazepina (CBZ) es objeto continuo de estudio por su amplia variedad de polimorfos. CBZ tiende a la formación de co-cristales y solvatos, por ejemplo CBZ: ácido acético (AcOH).<sup>83</sup> Otros factores a tener en cuenta cuando se trata de fármacos en forma sólida son: baja solubilidad, baja biodisponibilidad de los sólidos cristalinos y la tendencia de los mismos a existir frecuentemente en su forma amorfa.

Una alternativa para evitar problemas con el polimorfismo es la formación de ILs con puntos de fusión próximos a la temperatura ambiente. Los ILs aportarían comportamientos nuevos y únicos lo que podría mejorar diferentes propiedades como la solubilidad y la dosis terapéutica del fármaco. Desde el punto de vista farmacéutico, la amplia variedad de combinaciones entre cationes y aniones ofrecer un amplio rango de hidrofobicidad / hidrofilia, acidez / basicidad y viscosidad; siendo estas fundamentales en la preparación de potenciales medicamentos.

Se ha publicado el uso de los ILs como vehículos para la liberación de fármacos, como por ejemplo ILs en forma de micro-emulsiones para fármacos de uso

---

<sup>83</sup> Cruz Cabeza, A. J.; Day, G. M.; Motherwell, W. S.; Jones, W. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, 14466.

tópico. Algunos ILs derivados de imidazolinio han demostrado su utilidad como sistemas de liberación controlada de fármacos.<sup>84</sup>

#### **2.1.2.1. Líquidos iónicos duales a partir de APIs**

En 2007, el grupo de Robin Roger describió una serie de ILs basados en ingredientes farmacéuticos activos (APIs). Su diseño se basó en la sustitución de los contraiones típicos como el sodio y el bromuro por otros alternativos, con el objetivo de reducir el punto de fusión de la sal y obtener formas líquidas a temperatura ambiente. Si además el contraión posee actividad farmacológica el compuesto final podría actuar con actividad dual. La elección del contraión puede realizarse en función de la actividad terapéutica deseada por ejemplo para la obtención de un efecto sinérgico, para neutralizar los posibles efectos secundarios del ión activo o simplemente para obtener dos efectos terapéuticos independientes. En la bibliografía se han descrito ILs como co-disolventes para disolver diferentes APIs (Active Pharmaceutical Ingredients) cuya solubilidad en agua es muy baja.<sup>85</sup> Se ha publicado el uso de los ILs como vehículos para la liberación de fármacos, como por ejemplo ILs en forma de micro-emulsiones para fármacos de uso tópico.

En la actualidad diversos grupos han centrado su investigación en el diseño y síntesis de ILs farmacéuticamente / biológicamente activos. Hough *et al.* han descrito una serie de ILs basados en diferentes cationes y aniones activos, por

---

<sup>84</sup> Moniruzzaman, M.; Kamiya, N.; Goto, M. *Journal of Colloid and Interface Science* **2010**, 352, 136.

<sup>85</sup> Smith, K.; Bridson, R.; Leeke, G. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2011**, 56, 2039.

ejemplo el compuesto docusato de lidocaína (Figura 37).<sup>86</sup> Este IL muestra una solubilidad mayor, un aumento de la estabilidad térmica y una mejora significativa de la actividad analgésica cuando se compara con clorhidrato de lidocaína.

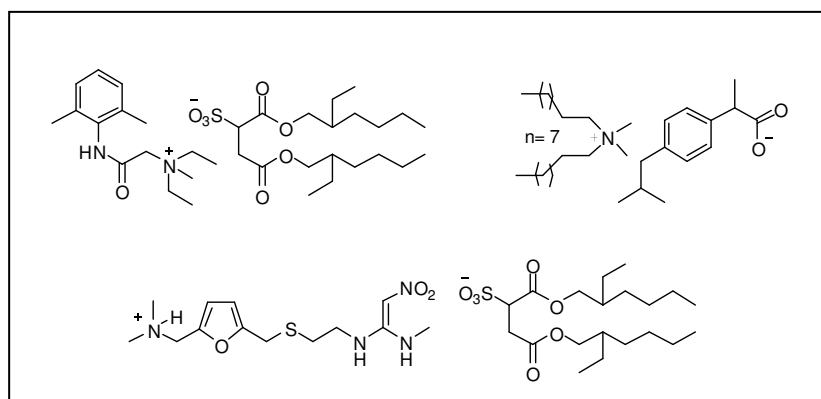


Figura 37. ILs farmacológicamente activos.

Por otro lado, Bica y colaboradores han descrito recientemente ILs basados en compuestos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios. Con el fin de obtener una actividad dual han sintetizado una serie de ILs combinando el ácido acetilsalicílico o su metabolito, el ácido salicílico, con una variedad de cationes activos con propiedades analgésicas y antibacterianas (Figura 38).<sup>87</sup>

<sup>86</sup> Hough, W. L.; Smiglak, M.; Rodríguez, H.; Swatloski, R. P.; Spear, S. K.; Daly, D. T.; Pernak, J.; Grisel, J. E.; Carliss, R. D.; Soutullo, M. D. *New Journal of Chemistry* **2007**, *31*, 1429.

<sup>87</sup> Bica, K.; Rijksen, C.; Nieuwenhuyzen, M.; Rogers, R. D. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12*, 2011.

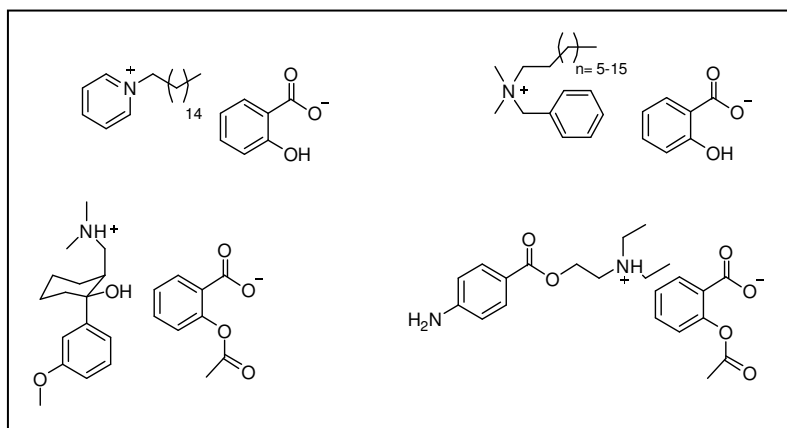


Figura 38. ILs derivados de salicilato y acetilsalicilato.

Como antibacterianos existen numerosas publicaciones recientes en las que diferentes líquidos iónicos de imidazolio, amonio cuaternario y piridinio exhiben excelentes actividades antibacterianas frente a distintos microorganismos.<sup>88</sup> Sus propiedades principales como una volatilidad muy baja, comportarse como líquidos a temperatura ambiente (RTILs), viscosidad, estabilidad térmica y el hecho de no ser inflamables les facilita su uso como biocidas superficiales. Otros líquidos iónicos basados en amonio y benzalconio como cationes combinados con los aniones sacarinato y acesulfamato [sal sódica de la 1,1-dioxobenzo-1,2-tiazol-3-ona; sal potásica del 6-metil-1,2,3-oxatiazin-4 (3*H*)-ona-

<sup>88</sup> Alberto, E. E.; Rossato, L. L.; Alves, S. H.; Alves, D.; Braga, A. L. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, 9, 1001.

2,2-dióxido, respectivamente] han mostrado actividad antibacteriana (Figura 39).<sup>89</sup>

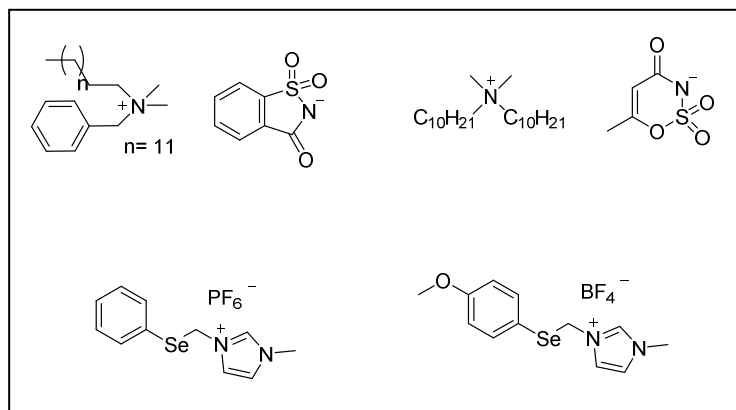


Figura 39. Ejemplos de agentes antibacterianos.

La forma de crecimiento de los microorganismos en forma de colonias denominadas “biofilm” muestran una tendencia a la tolerancia o resistencia a antibióticos y antimicrobianos. Diferentes líquidos iónicos derivados de cloruros de 1-alkil-3-metilimidazolio y bromuros de 1-alkilquinolinio han mostrado actividad antibacteriana y “antibiofilm” en un panel de bacterias clínicamente relevantes (Figura 40).<sup>90</sup>

<sup>89</sup> Hough-Troutman, W. L.; Smiglak, M.; Griffin, S.; Reichert, W. M.; Mirska, I.; Jodynis-Liebert, J.; Adamska, T.; Nawrot, J.; Stasiewicz, M.; Rogers, R. D. *New Journal of Chemistry* **2009**, 33, 26.

<sup>90</sup> Carson, L.; Chau, P. K.; Earle, M. J.; Gilea, M. A.; Gilmore, B. F.; Gorman, S. P.; McCann, M. T.; Seddon, K. R. *Green Chemistry* **2009**, 11, 492.



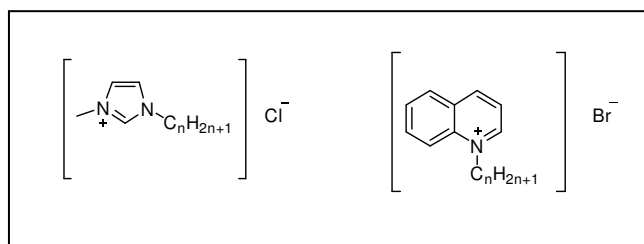


Figura 40. Estructura general de “agentes antibiofilm”.

Otra de las aplicaciones terapéuticas de los líquidos iónicos es en el campo de los anticancerosos. Líquidos iónicos basados en los cationes de fosfonio y amonio han mostrado actividad anticancerosa en líneas celulares tumorales.<sup>91</sup> Recientemente, se ha publicado una familia de líquidos iónicos de amonio y imidazolio con actividad en células tumorales de cerebro humano mostrando una citotoxicidad baja a la concentración efectiva.<sup>92</sup>

#### 2.1.2.2. Líquidos iónicos: permeabilidad biológica

Los ILs próticos (PILs) son un subtipo de líquidos iónicos formados por ácidos y bases de Brønsted. En ocasiones estas sales dan lugar a ILs, mientras que en otros casos forman estructuras moleculares rígidas cuyos puntos de fusión son elevados. Estos ILs presentan propiedades ácidas debido a que poseen un protón intercambiable, y esta característica les convierte, por ejemplo, en

<sup>91</sup> Kumar, V.; Malhotra, S. V. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 4643.

<sup>92</sup> Kaushik, N. K.; Attri, P.; Kaushik, N.; Choi, E. H. *Molecules* **2012**, 17, 13727.

excelentes disolventes para reacciones catalizadas por ácidos. Las propiedades de PILs vienen determinadas por la transferencia del protón libre a la base.

Dichas propiedades se estudian por las siguientes técnicas: espectrofotometría FTIR con ATR (FTIR-ATR: Fourier transform infrared spectroscopy-Attenuated Total Reflectance) y "Walden plot", siendo esta última un método para comparar dos propiedades de transporte como son conductividad molar y viscosidad.

Los resultados obtenidos indican que los líquidos iónicos próticos con ionicidad baja presentan una mayor capacidad para atravesar las membranas biológicas, hecho que podría deberse a la formación de enlaces de hidrógeno.<sup>93</sup>

Es conocido que los fármacos iónicos tienen dificultad para atravesar las bicapas lipídicas debido a su insuficiente lipofilia. Estudios en modelos de membrana han mostrado como las sales de salicilato con contraiones comunes en las formulaciones farmacéuticas como sodio no atraviesan fácilmente las membranas biológicas. En cambio, la combinación de este principio activo con contraiones de naturaleza orgánica ha dado lugar a ILs con mayor permeabilidad.<sup>94</sup>

---

<sup>93</sup> Stoimenovski, J.; MacFarlane, D. R. *Chemical Communications* **2011**, 47, 11429.

<sup>94</sup> Stoimenovski, J.; Dean, P. M.; Izgorodina, E. I.; MacFarlane, D. R. *Faraday Discussions* **2012**, 154, 335.

## 2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.2.1. SÍNTESIS DE ILs DUALES A PARTIR DE ÁCIDOS Y BASES DE BrØNSTED

En relación a lo expuesto anteriormente, se han sintetizado 28 combinaciones de APIs, de las cuales únicamente el compuesto **54** estaba descrito en la bibliografía. Se han llevado a cabo los estudios de estabilidad térmica (TGA), calorimetría diferencial de barrido (DSC), difracción de rayos X en ángulo grande (WAXS) y RMN de las combinaciones sintetizadas. Los APIs seleccionados se utilizan como anestésicos, antiinflamatorios, antidiabéticos, edulcorantes y emolientes.

Además, debido al interés que tiene conocer el estado de ionicidad de los líquidos iónicos, en este capítulo, se ha puesto a punto un método para su cálculo utilizando RMN. Los ensayos se han llevado a cabo en DMSO con el fin de conocer el comportamiento de las combinaciones de APIs en disolución y como podría afectar dicho disolvente a su ionicidad.

Los anestésicos locales ejercen su acción mediante el bloqueo de canales de sodio, se unen a sitios hidrofóbicos determinados evitando la llegada de cationes de Na al canal y presentan diferencias en el inicio y en la duración del efecto del fármaco. Se ha publicado la combinación de anestésicos locales con fármacos

antiinflamatorios no esteroideos (AINE) demostrándose que el efecto analgésico se prolonga cuando la proporción del anestésico local disminuye.<sup>95</sup>

Los AINE son fármacos antiinflamatorios no esteroideos que poseen propiedades analgésicas y antipiréticas. Estos fármacos ejercen su acción por inhibición de la enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), necesarias para la síntesis de prostaglandinas. Entre los AINE más destacados están el diclofenaco, el ibuprofeno y el naproxeno.<sup>96</sup>

Por otro lado, la metformina ocupa una posición muy importante en las listas de fármacos genéricos, ya que aparte de su aplicación más importante como fármaco antidiabético también se ha utilizado para el tratamiento de acné y del síndrome de ovario poliquístico (PCOS).<sup>97</sup> El ácido salicílico es utilizado para el tratamiento del acné y otras enfermedades de la piel, por lo que una combinación de ambos APIs podría mejorar las propiedades farmacéuticas de ambos principios activos por separado.

Sacarinato y acesulfamato son edulcorantes sintéticos ampliamente utilizados para dotar de un sabor dulce a productos que inicialmente son amargos. Finalmente, el anión docusato es un emoliente cuya sal sódica esta aprobada por la FDA. Ha sido utilizado en la preparación de una gran variedad de ILs y su hidrofobicidad le confiere una mayor permeabilidad de a la membrana.<sup>98</sup>

---

<sup>95</sup> Stewart, M.; Stookey, J.; Stafford, K.; Tucker, C.; Rogers, A.; Dowling, S.; Verkerk, G.; Schaefer, A.; Webster, J. *Journal of Dairy Science* **2009**, 92, 1512.

<sup>96</sup> Peterson, K.; Dana, T.; Roberts, M. C.; Chou, R.; Helfand, M. *Update* **2006**, 4.

<sup>97</sup> Norman, R. J.; Moran, L. J. *Polycystic Ovary Syndrome* **2000**, 98.

<sup>98</sup> Cojocaru, O. A.; Bica, K.; Gurau, G.; Narita, A.; McCrary, P. D.; Shamshina, J. L.; Barber, P. S.; Rogers, R. D. *MedChemComm* **2013**.

La serie de ácidos y bases de Brønsted seleccionados para la síntesis de las 28 combinaciones están recogidas en la Tabla 8.

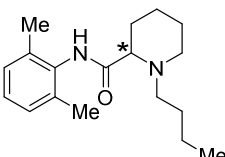
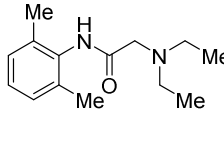
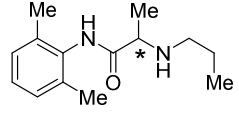
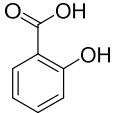
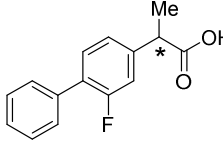
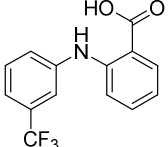
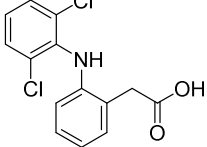
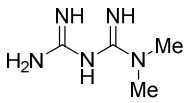
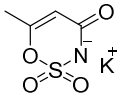
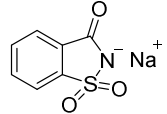
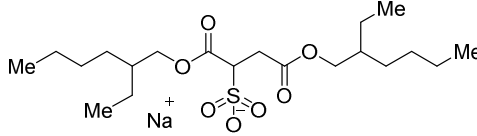
<p style="text-align: center;"><b>Anestésicos locales</b></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>Bupivacaina (R,S)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Lidocaina</p> </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  <p>Prilocaina (R,S)</p> </div>	<p style="text-align: center;"><b>Ácidos antiinflamatorios</b></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>Ácido salicílico</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Flurbiprofen</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>Ácido flufenámico</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Diclofenaco</p> </div> </div>
<p style="text-align: center;"><b>Antidiabético</b></p> <div style="text-align: center;">  <p>Metformina</p> </div>	<p style="text-align: center;"><b>Edulcorantes</b></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>Acesulfamato potásico</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Sacarinato sódico</p> </div> </div>
<p style="text-align: center;"><b>Emoliente</b></p> <div style="text-align: center;">  <p>Docusato sódico</p> </div>	

Tabla 8. Ácidos y bases de Brønsted.

Las combinaciones de APIs sintetizadas en esta memoria se han agrupado en cuatro grupos que se refieren a lidocaína, bupivacaína, prilocaína y metformina.

La metodología utilizada para la síntesis se describe en la parte experimental del capítulo.

*Líquidos iónicos basados en lidocaína (48-54).*

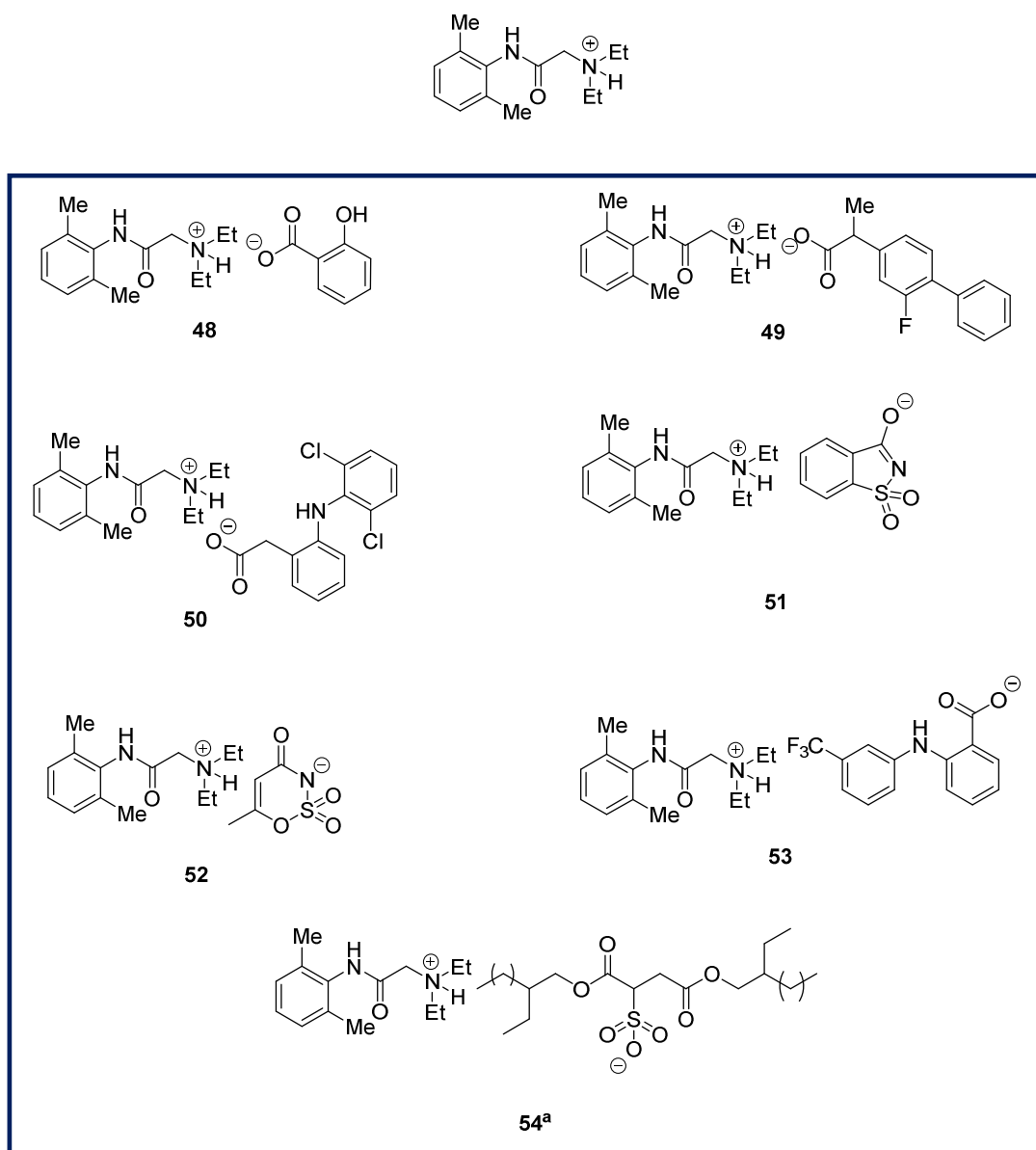


Figura 41. ILs basados en lidocaína.

*Líquidos iónicos basados en bupivacaína (55-61).*

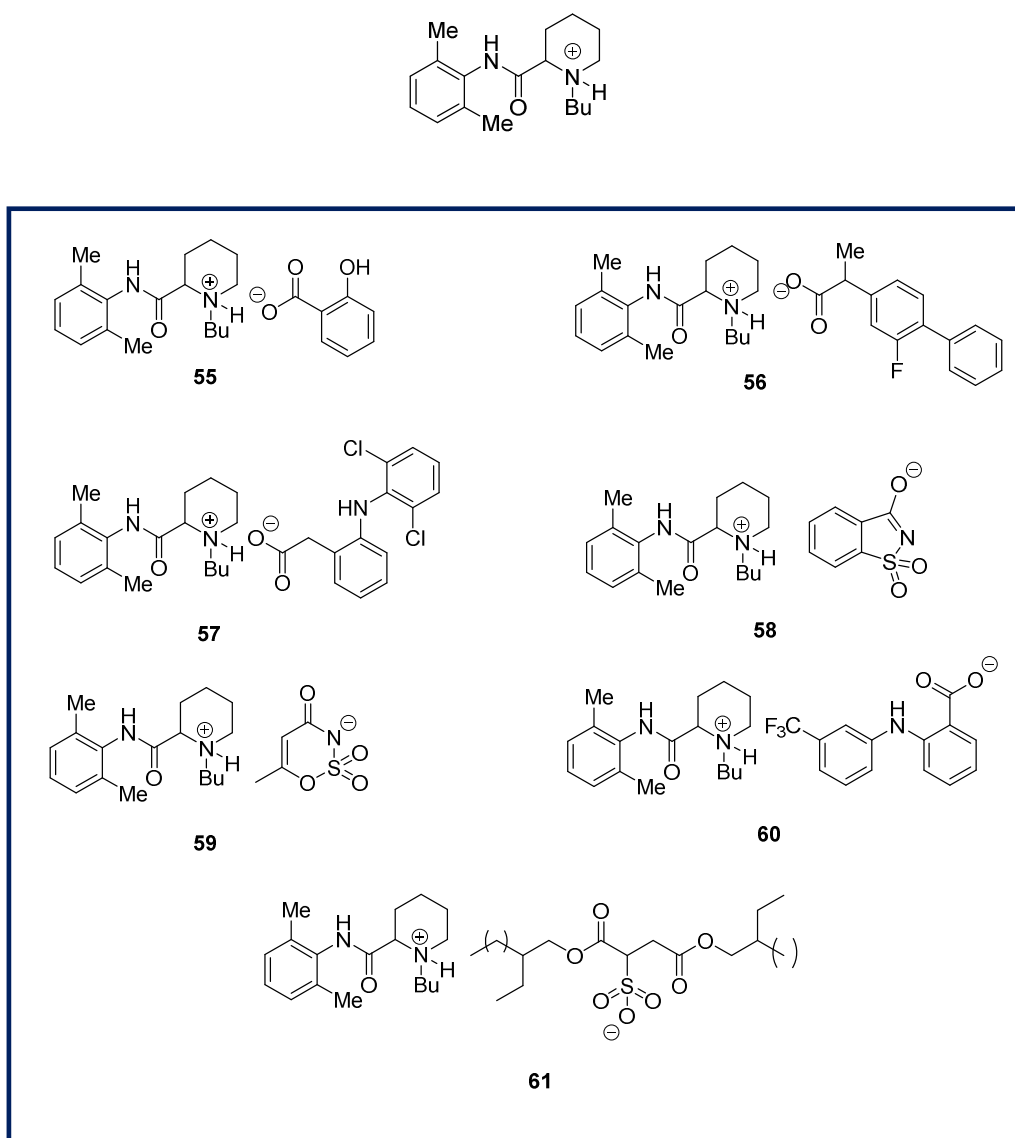


Figura 42. ILs basados en bupivacaína.

*Líquidos iónicos basados en prilocaína (62-68).*

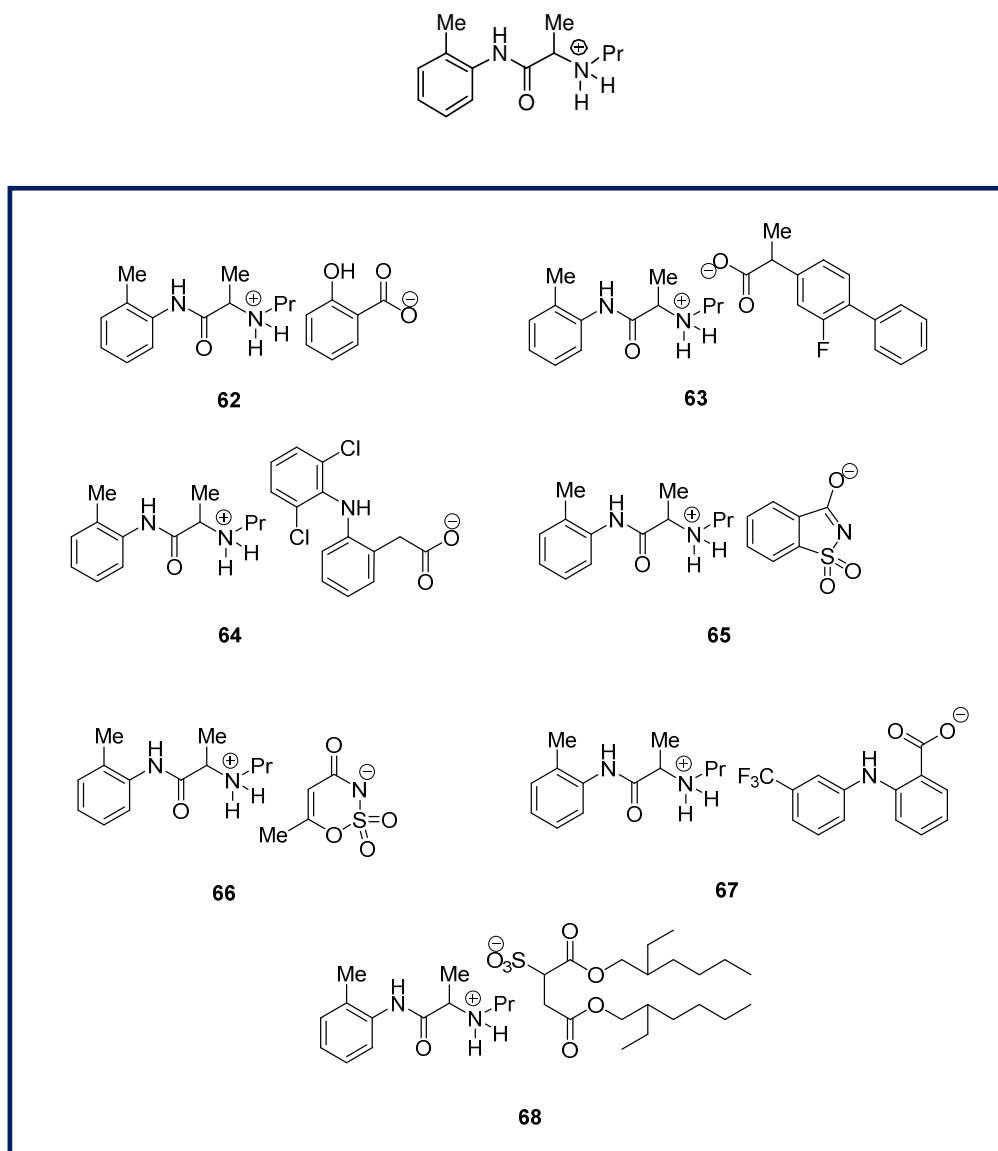


Figura 43. ILs basados en prilocaína.



*Líquidos y sales iónicas basadas en metformina (69-75).*

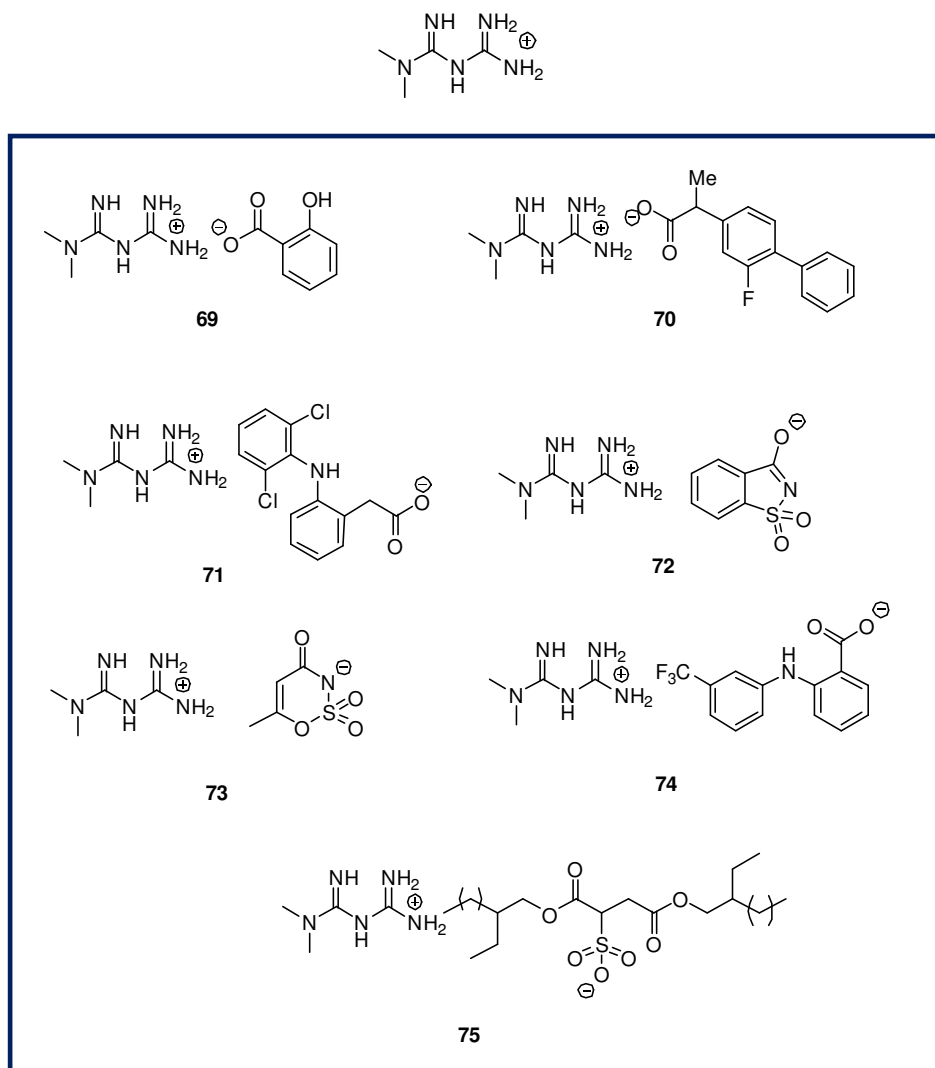


Figura 44. ILs basados en metformina.

### 2.2.2. CARACTERIZACIÓN DE ILs MEDIANTE TGA/DSC

Se han realizado los estudios de estabilidad térmica (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las 28 combinaciones sintetizadas. Estos estudios se han llevado a cabo en ICTP (Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros) en colaboración con Dr. Carlos Marco.

La estabilidad térmica es una de las características más importantes de los ILs ya que en la mayor parte de los casos presentan temperaturas de descomposición elevadas. Estas medidas de estabilidad térmica se realizan mediante análisis termogravimétricos. Son experimentos de estabilidad a corto plazo en los que se mide la variación de masa de una muestra cuando es sometida a un gradiente de temperatura en una atmósfera controlada.<sup>99</sup>

En el análisis de los diagramas se determina la temperatura a la cual comienza a descomponer la muestra,  $T_{\text{onset}}$ . (de "onset", comienzo). Concretamente, se determina la  $T_{\text{onset } 5\%}$  o  $T_{\text{onset } 10\%}$ , es decir, la temperatura a la cual se produce la pérdida del 5-10 % de masa, respectivamente.

El análisis de DSC es una técnica que determina la temperatura y las entalpías asociadas a transiciones de primer y segundo orden, es decir, permite identificar procesos de fusión, cristalización y transiciones vítreas. Este ensayo aporta información cualitativa y cuantitativa sobre transiciones físico-químicas que ocurren tanto en procesos endotérmicos como exotérmicos.

---

<sup>99</sup> Maton, C.; De Vos, N.; Stevens, C. V. *Chemical Society Reviews* **2013**.

El comportamiento de sólidos cristalinos y sólidos amorfos es muy diferente en los ensayos de DSC. Las muestras son sometidas a tres ciclos de temperatura: calentamiento, enfriamiento y calentamiento a unas velocidades determinadas. Las combinaciones de APIs sintetizadas han mostrado diferencias en sus estados sólidos, concretamente 22 de ellas son ILs (Líquidos iónicos a T ambiente) y 6 son sales sólidas.

### *ILs de lidocaína*

#### *TGA*

Los experimentos de TGA se llevan a cabo por calentamiento de la muestra a 800 °C, a una velocidad de 10 °C/min y bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. A continuación, en las figuras 45 y 46 se representan los termogramas de dos ejemplos significativos de lidocaína, diclofenaco de lidocaína (Figura 45) y acesulfamato de lidocaína (Figura 46), en ambos casos sus T<sub>onset</sub> 5 % son 186 °C y 179 °C, respectivamente.

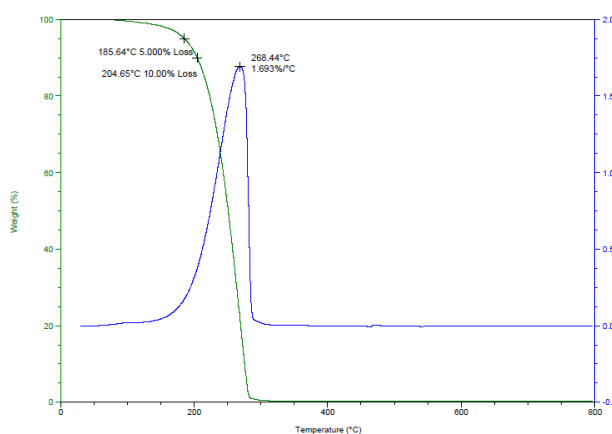


Figura 45. TGA muestra diclofenaco de lidocaína

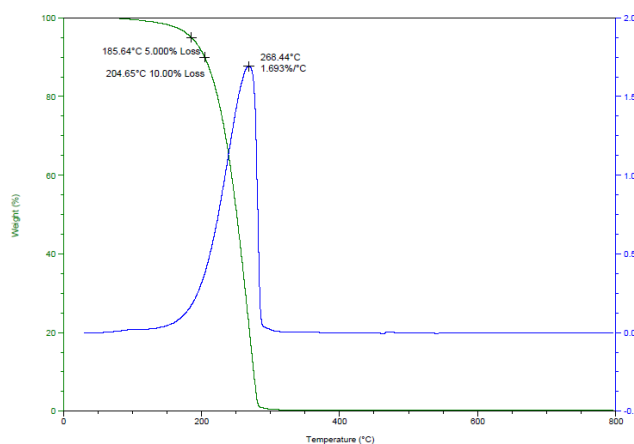


Figura 46. TGA muestra acesulfamato de lidocaína.

Los valores obtenidos para los ILs de lidocaína sintetizados se indican en la Tabla 9, como se observa todas las combinaciones muestran una  $T_{\text{onset } 5\%}$  superior a la de clorhidrato de lidocaína ( $T_{\text{onset } 5\%} = 147\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Así, se ha demostrado por un lado que las combinaciones no poseen clorhidrato de lidocaína y por otro lado, que la estabilidad térmica es mayor cuando el anestésico local está combinado con determinados APIs.

COMPUESTO	$T_{\text{onset } 5\%}\text{ (}^{\circ}\text{C)}$
48	-
49	166
50	186
51	179
52	165
53	167
54	-

Tabla 9. Valores de  $T_{\text{onset } 5\%}$  de los compuestos **48-54**.

### DSC

En la Figura 47 se muestra el diagrama de DSC correspondiente a la muestra de lidocaína flufenámico, durante el primer calentamiento a 5 °C/min se observa una transformación endotérmica con un máximo a 86.2 °C correspondiente a un proceso de fusión ( $T_m$ ). El análisis de este primer ciclo indica que se trata de un sólido cristalino, porque esta transformación de primer orden ocurre en ausencia de transiciones vítreas, características de sólidos amorfos. A continuación, el líquido desordenado se somete a enfriamiento y a lo largo de este ciclo no es posible alcanzar el orden inicial, observándose una transición vítrea,  $T_g = 3.4$  °C. Finalmente, la muestra “congelada”, sin orden molecular, se somete al último ciclo de calentamiento y como se observa en la gráfica se produce una transición vítrea,  $T_g = -1.8$  °C, donde la muestra adquiere movimiento molecular pero manteniendo el desorden estructural. La muestra ha fundido en el primer ciclo pero no ha sido posible su cristalización en ninguno de los dos ciclos posteriores, y por tanto no se ha conseguido recuperar el orden estructural que poseía inicialmente.

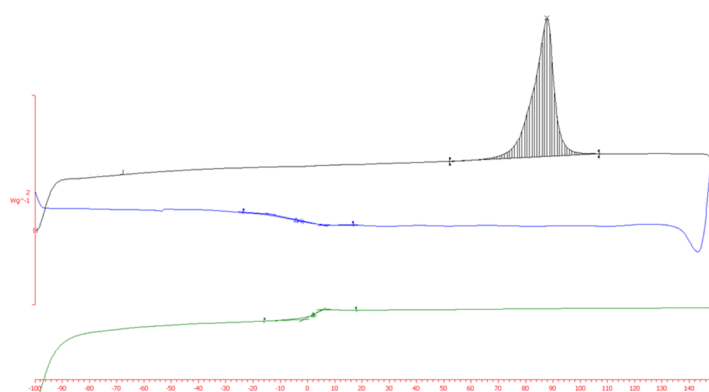


Figura 47. Diagrama de DSC de lidocaína flufenámico (53).

En la Tabla 10 se indican los resultados obtenidos de los ensayos de DSC de los derivados **48-54**.

COMPUESTO	CALENTAMIENTO 1		ENFRIAMIENTO		CALENTAMIENTO 2		
	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>CC</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)
<b>48<sup>a</sup></b>							
<b>49</b>	-29.5		-25.7		-29.02		
<b>50</b>	-8.49		4.27		-20.61		
<b>51</b>	16.95	92.38	27.44		20.07		
<b>52</b>	90.62		26.63		17.35		
<b>53</b>		78.69	3.36		-1.78		
<b>54<sup>a</sup></b>							

Tabla 10. DSC de los compuestos **48– 54**.

### *ILs de bupivacaína*

#### TGA

En la Figura 48 se muestra el termograma de bupivacaína-flufenámico, que se observa la muestra presenta una T<sub>onset 5%</sub>= 151 °C.

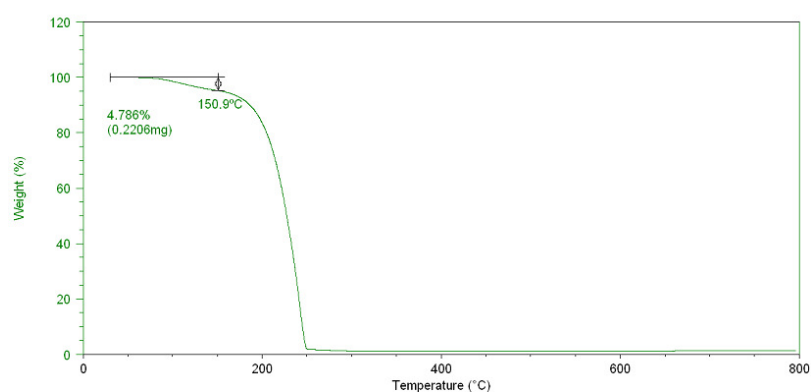


Figura 48. TGA muestra bupivacaína-flufenámico.

En la Tabla 11, se muestran los resultados de  $T_{\text{onset 5\%}}$  y  $T_{\text{onset 10\%}}$  de los derivados de bupivacaína **55-61**.

COMPUESTO	$T_{\text{onset 5\%}} (^{\circ}\text{C})$	$T_{\text{onset 10\%}} (^{\circ}\text{C})$
55	160.1	176.7
56	180.0	199.1
57	145.3	187.9
58	201.2	219.8
59	200.6	213.7
60	172.4	189.4
61	275.0	288.5

Tabla 11. Valores de  $T_{\text{onset 5\%}}$  y  $T_{\text{onset 10\%}}$  de los derivados **55-61**.

## DSC

El análisis del DSC de bupivacaína-flufenámico (Figura 49) indica un comportamiento como sólido amorfo. Al inicio del primer ciclo de calentamiento el sólido “congelado” está desordenado y sin movimiento molecular, tras aumentar la temperatura y adquirir energía aparece una transición vítrea,  $T_g = 3.0$   $^{\circ}\text{C}$ , y las moléculas comienzan a moverse, pero tras finalizar el ciclo no se ha observado su fusión. A continuación, se enfría y se observa de nuevo otra transición vítrea,  $T_g = 6.9$   $^{\circ}\text{C}$ , en esta ocasión se produce al restar energía al sistema. Finalmente, se obtiene una transición vítrea,  $T_g = 1.7$   $^{\circ}\text{C}$ , tras el último calentamiento. En este caso no se han producido transformaciones de primer orden, fusión o cristalización, en ninguno de los ciclos realizados.

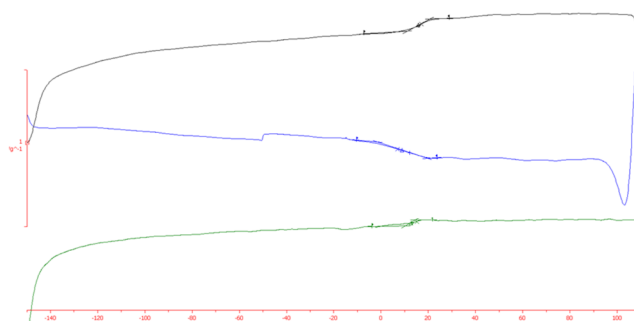


Figura 49. Diagrama de DSC de bupivacaína–flufenámico (**60**).

A continuación se resumen los datos obtenidos de los ensayos de DSC para los derivados **55-61** (Tabla 12).

COMPUESTO	CALENTAMIENTO 1		ENFRIAMIENTO		CALENTAMIENTO 2	
	$T_g$ (°C)	$T_m$ (°C)	$T_g$ (°C)	$T_c$ (°C)	$T_g$ (°C)	$T_{cc}$ (°C)
<b>55</b>	14.6	-	11.7		11.8	
<b>56</b>	4.7		-2.4		1.4	
<b>57</b>	6.3		-1.2		3.1	
<b>58</b>	20.7		18.7		19.1	
<b>59</b>	19.3		21.2		17.5	
<b>60</b>	13.4		16.0		15.5	
<b>61</b>	-25.3		-33.8		-25.0	

Tabla 12. Datos de DSC de los compuestos **55-61**.

### *ILs de prilocaína*

#### TGA

En la Figura 50 se muestra el diagrama de TGA de la muestra prilocaína flurbiprofen (**63**), como se indica este derivado de prilocaína presenta una  $T_{onset}$  5% y  $T_{onset}$  10% de 160.02 y 173.35 °C, respectivamente.



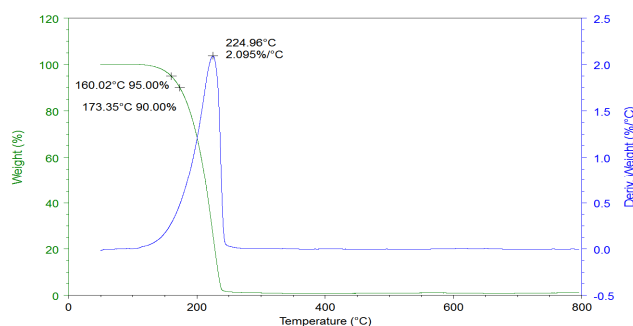


Figura 50. Diagrama de TGA de prilocaina flurbiprofen (**63**).

A continuación, se indican los valores de  $T_{\text{onset 5\%}}$  y  $T_{\text{onset 10\%}}$  obtenidos para los derivados **62-68** (Tabla 13).

COMPUESTO	$T_{\text{onset 5\%}} (^{\circ}\text{C})$	$T_{\text{onset 10\%}} (^{\circ}\text{C})$
62	158.7	168.4
63	160.0	173.4
64	165.4	177.3
65	200.4	216.8
66	188.8	292.0
67	177.4	190.4
68	259.1	272.5

Tabla 13. Valores de  $T_{\text{onset 5\%}}$  y  $T_{\text{onset 10\%}}$  de los derivados **62-68**.

## DSC

En la Figura 51 se indica el diagrama de DSC de la muestra prilocaina flurbiprofen (**63**), la temperatura final de calentamiento en este ensayo corresponde aproximadamente a la  $T_{\text{onset 5\%}}$  indicada en el diagrama de TGA. Esta muestra se presenta inicialmente como sólido cristalino ya que en el primer

ciclo de calentamiento se observa su fusión,  $T_M = 103.94\text{ }^{\circ}\text{C}$ , correspondiente a una transformación endotérmica. Tras los ciclos de enfriamiento y calentamiento sólo se observan transiciones vítreas, por lo que la muestra no adopta su estructura cristalina inicial.

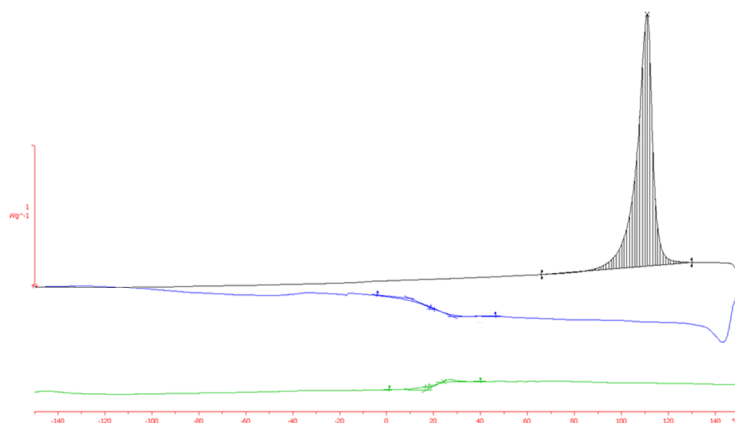


Figura 51. Diagrama de DSC de la muestra prilocaína flurbiprofen (**63**).

Como se observa en la Tabla 14 se indica los  $T_M$  de los derivados **63-67**, esto indica que se muestra inicialmente como sólidos cristalinos.

COMPUESTO	CALENTAMIENTO 1		ENFRIAMIENTO		CALENTAMIENTO 2	
	$T_g$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_g$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_c$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_g$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	TCC ( $^{\circ}\text{C}$ )
<b>62<sup>a</sup></b>	-					
<b>63</b>	-	109.6	20.7		16.7	
<b>64</b>		120.8	37.4		38.0	
<b>65</b>		141.8	38.3		36.1	
<b>66</b>		143.9	14.4		15.0	
<b>67</b>		101.0	21.8		22.9	
<b>68</b>	-28.3	53.3	-30.5		-26.1	

Tabla 14. Valores de DSC de los derivados **62-63**.

*ILs de metformina***TGA**

Las combinaciones de APIs basadas en metformina se comportan como sales iónicas sólidas salvo docusato de metformina cuyo comportamiento es de líquido iónico a temperatura ambiente. Un factor importante en estas combinaciones es que tanto en el catión guanidinio como en el anión salicilato la carga se encuentra deslocalizada, y esto podría influir en los resultados de ambos análisis.

En la Figura 52 se muestra el termograma del docusato de metformina y su análisis permite identificar el comienzo de la descomposición de la muestra,

$T_{\text{onset } 5\%} = 271\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $T_{\text{onset } 10\%} = 278\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

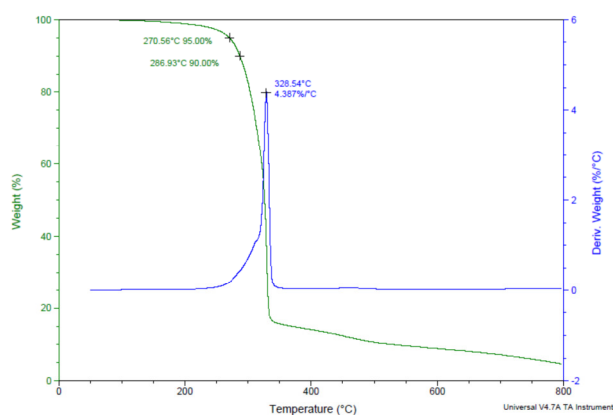


Figura 52. Diagrama de TGA de docusato de metformina (**75**).

En la siguiente Tabla 15 se indican los valores obtenidos en los termogramas de DSC para los derivados de metformina **69-75**.

LÍQUIDO IÓNICO	T <sub>onset</sub> 5 % (° C)	T <sub>onset</sub> 10 % (° C)
69	180.1	190.2
70	205.5	213.7
71	150.2	140.3
72	232.8	248.3
73	215.1	228.6
74	191.6	210.2
75	271	278

Tabla 15. Valores de T<sub>onset</sub> 5% y T<sub>onset</sub> 10% de los derivados **69-75**.

## DSC

El salicilato de metformina ha mostrado unos resultados muy interesantes en los ensayos de DSC (Figura 53). Un factor importante en estas combinaciones es que tanto en el catión guanidinio como en el anión salicilato la carga se encuentra deslocalizada, esto podría influir en los resultados de ambos análisis. Cuando la muestra original de salicilato de metformina se calienta a 5 °C/min se observa transición endotérmica, con un máximo de 147.5 – 147.8 °C, correspondiente a la fusión del sólido (T<sub>m</sub>). Durante este primer calentamiento la muestra no sufre transiciones vítreas típicas de sólidos amorfos. Durante el ciclo de enfriamiento (10 °C/min) no se observó ningún proceso de cristalización exotérmica, por lo que no fue posible recuperar el orden estructural de la muestra. Se ha demostrado la influencia de las velocidades de los procesos en las diferentes transiciones de primer orden, por ello, en este caso, se llevó a

cabo el correspondiente enfriamiento a  $2 - 5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . En ninguno de los casos se consiguió el proceso de cristalización.

Durante el calentamiento a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (ensayo R10) se produce una transición vítrea, seguida de una transición exotérmica asociada a una cristalización localizada a  $86.7\text{ }^{\circ}\text{C}$  y de la fusión de los cristales formados durante el calentamiento ( $T_m = 142.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

El proceso de cristalización es dependiente de la velocidad utilizada, cuando la velocidad es baja de  $2 - 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  la transformación exotérmica ocurre a una temperatura más baja  $79.8$  y  $78.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente.

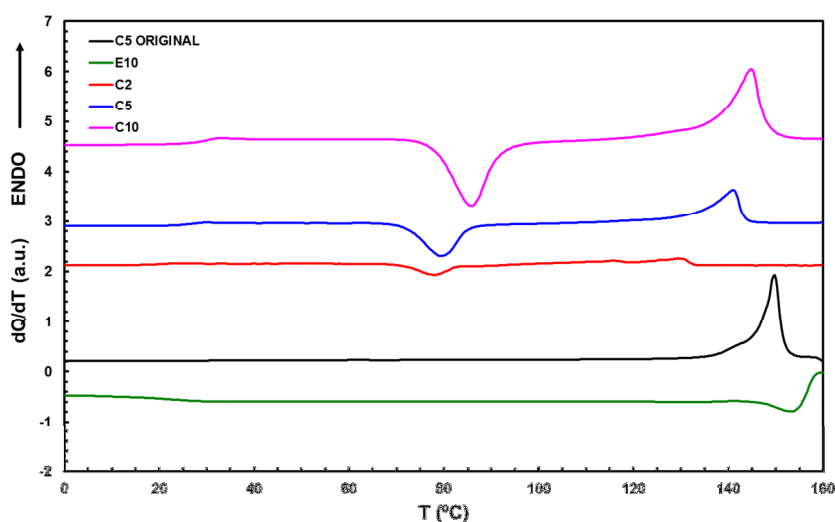


Figura 53. DSC de salicilato de metformina (**69**).

A continuación se resumen los datos obtenidos de los ensayos de DSC para los derivados **69-75** (Tabla 16).

COMPUESTO	CALENTAMIENTO 1		ENFRIAMIENTO		CALENTAMIENTO 2		
	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>c</sub> (°C)	T <sub>g</sub> (°C)	T <sub>cc</sub> (°C)	T <sub>m</sub> (°C)
69		144	26.70	96.38	25.54	74.0	
70 <sup>a</sup>							
71	-20		11.37		-11.9		
72		151.5-159.5	22.4		24.3	117.1	144.1
73		142.0-146.2	23.0		22.2		
74		90.8-112.9	-3.5		-0.8	70.6-84.1	105.8-117.7
75	-32		-27		-27		

Tabla 16. Valores de DSC de los derivados **69-75**.

### 2.2.3. ENSAYOS WAXS

Debido al comportamiento observado de salicilato de metformina en los experimentos de DSC se decidió ampliar su estudio estructural mediante la técnica de difracción de rayos X en ángulos grandes (WAXS).

Los estudios de difracción de rayos X en ángulos grandes se realizan para obtener una información estructural más avanzada. Recientemente, se ha demostrado mediante la técnica de WAXS el efecto de los AINE en la regulación de las propiedades biofísicas de las membranas lipídicas. Se ha demostrado que las alteraciones observadas en las membranas podrían estar relacionadas con el mecanismo de acción de los AINE y con sus efectos secundarios adversos.<sup>100</sup>

Los experimentos de WAXS se realizaron en las mismas condiciones experimentales que los ensayos de DSC. En la Figura 54 se muestran los espectros de WAXs obtenidos a diferentes temperaturas y velocidades de calentamiento. En estos ensayos se realizan las medidas de las distancias (2 $\theta$ )

<sup>100</sup> Nunes, C.; Brezesinski, G.; Lima, J. L.; Reis, S.; Lúcio, M. *The Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*, 8024.

entre las capas de las estructuras cristalinas en función de la temperatura, y el resultado indica la distancia que más se repite bajo determinadas condiciones experimentales.

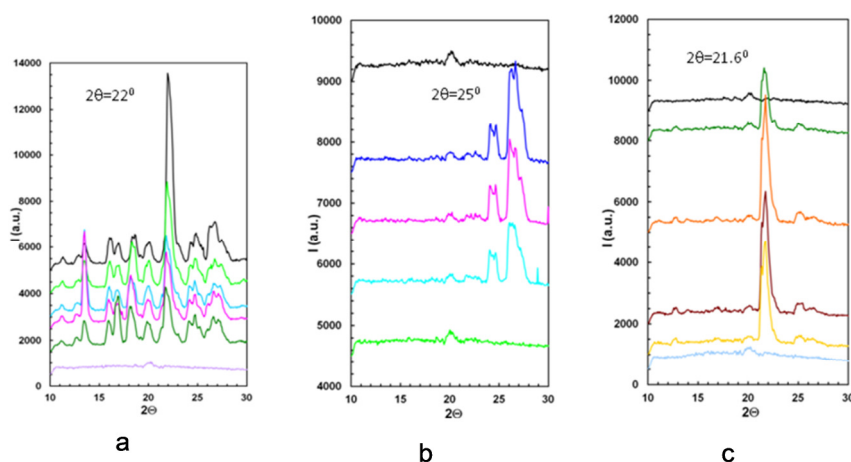


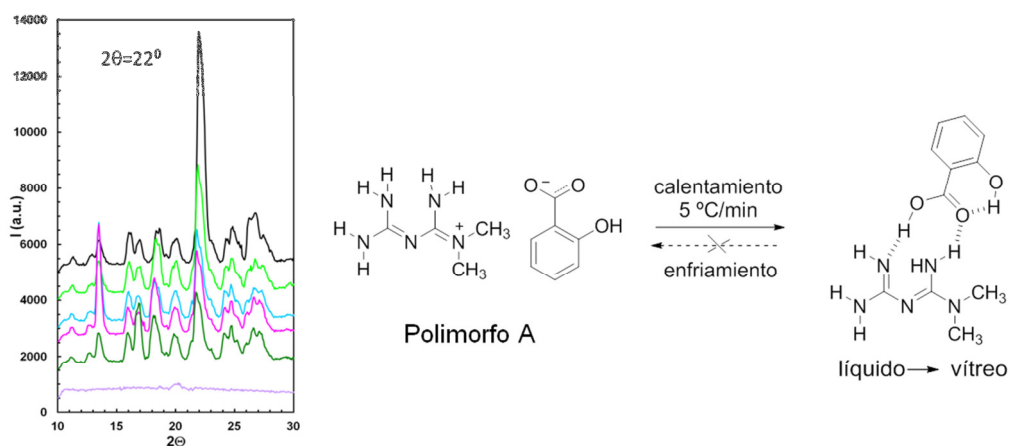
Figura 54. WAXS compuesto **69**. a) velocidad calentamiento 5, b) 2 y c) 10  $^\circ\text{C}/\text{min}$ .

La interpretación de los resultados se realiza combinando las dos técnicas: DSC y WAXS.

A 5  $^\circ\text{C}/\text{min}$  el pico de difracción mayoritaria se observó a 2 – 22  $^\circ\text{C}$  (polimorfo A)<sup>101</sup> y el termograma de DSC mostró la fusión de cristal a 147.7  $^\circ\text{C}$  transformándose en líquido. Tras el enfriamiento correspondiente se observó una transición vítrea pero no se produjo la reorganización estructural inicial de la sal de metformina salicilato (polimorfo A), transformándose en un complejo estabilizado por enlaces de hidrógeno. Ni los líquidos ni los vítreos son capaces

<sup>101</sup> Childs, S. L.; Chyall, L. J.; Dunlap, J. T.; Coates, D. A.; Stahly, B. C.; Stahly, G. P. *Crystal Growth & Design* **2004**, 4, 441.

de difractor, por esta razón se asumió que salicilato de metformina no se comporta como una sal inicialmente, sino como complejo no cristalino (Esquema 17).

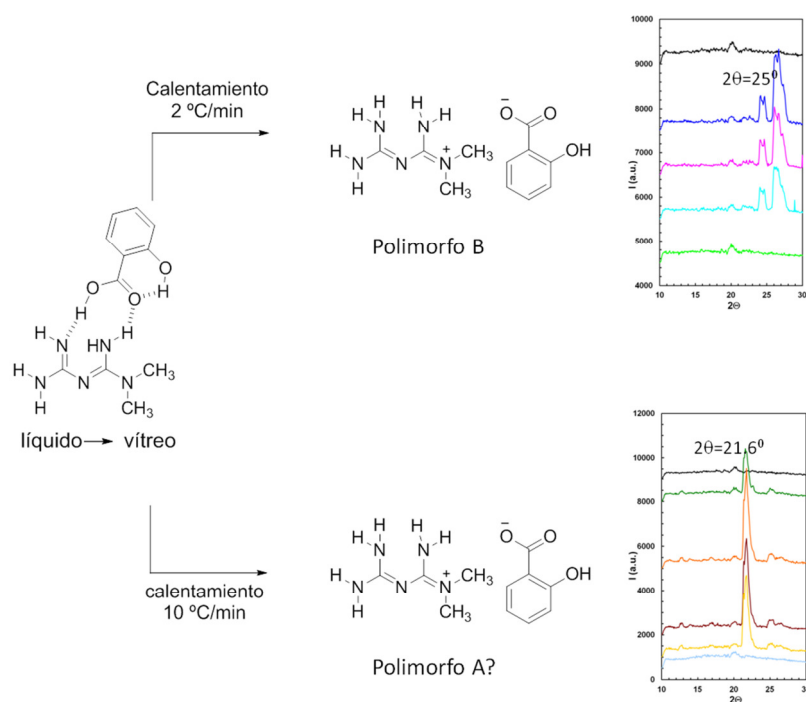


Esquema 17. Estructuras propuestas DSC - WAXS.

Como se observa en el Esquema 18, el comportamiento de los vítreos depende de la velocidad de calentamiento. A 2 °C/min el vítreo cristaliza, pero los cristales obtenidos muestran unos patrones de WAXS diferentes por lo que se ha considerado la formación de un polimorfo diferente, polimorfo B. Cuando se aumenta la velocidad de calentamiento el vítreo cristalizado muestra unos resultados de WAXS más similares a los del polimorfo A. El hecho de que no sea idéntico se podría deber a que el equilibrio no se ha completado.<sup>102</sup>

<sup>102</sup>Pérez-Fernández, R.; Fresno, N.; Goya, P.; Elguero, J.; Menéndez-Taboada, L.; García-Granda, S.; Marco, C. *Crystal Growth & Design* **2013**, *13*, 1780.





Esquema 18. Estructuras propuestas tras el calentamiento a 2 °C/ min y 10 °C/ min del compuesto x.

#### 2.2.4. CARACTERIZACIÓN POR RMN

Las combinaciones de APIs sintetizadas han mostrado diferencias en sus estados sólidos, y como ya se ha mencionado 17 de ellas son ILs y 11 son sales sólidas a temperatura ambiente. En este trabajo se ha puesto a punto un estudio de RMN con el fin de conocer el comportamiento de las combinaciones de APIs en disolución. Los métodos actuales para determinar la ionicidad son complicados y necesitan equipos muy sofisticados. Sin embargo, en nuestro caso, hemos puesto a punto un método para el cual sólo es necesario un equipo

de RMN convencional, registrándose los espectros en DMSO. En disolución las combinaciones de APIS pueden mantener su forma de sal iónica o comportarse como complejos por la transferencia de protón de la base al ácido. Esta transformación podría afectar a alguna de las propiedades importantes del fármaco, en particular la biodisponibilidad que es una de las propiedades farmacocinéticas principales.

En la Figura 55 se observan las transformaciones que pueden sufrir las combinaciones de APIs ensayadas en disolución. El gráfico de la derecha indica la situación de las combinaciones totalmente ionizadas, comportándose igual que su estado sólido. En la imagen de la izquierda se observa la transferencia de protón de la base al ácido y como resultado se obtiene el complejo, en este caso la presencia de DMSO afecta especialmente a la ionicidad de las sales. Finalmente, la imagen central indica una situación de mezcla sal-complejo.

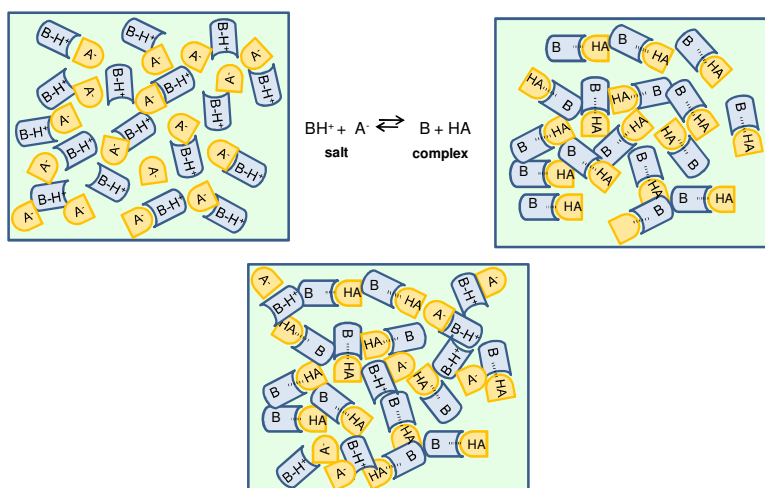
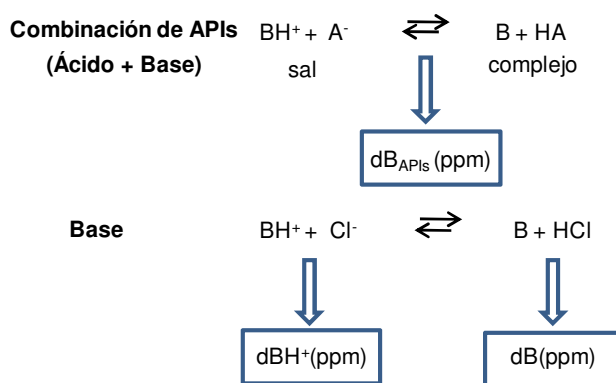


Figura 55. Equilibrios sal – complejo en disolución.

Como se observa en el Esquema 19, el estudio de RMN se ha basado en los principales equilibrios químicos tanto de la base como de los APIs correspondientes. El procedimiento seguido para cada una de las combinaciones estudiadas se resume en el Esquema 19.



Esquema 19. Equilibrios químicos APIs.

La formación de complejos (denominados "proton transferred compounds") se calcula a través del porcentaje de base no ionizada (B) en los APIs sintetizados y se determina por interpolación; de ambos modelos a través de la ecuación 1. Para ello, se lleva a cabo el estudio de los desplazamientos químicos en los espectros de  $^1H$  en DMSO de la base libre (B), el clorhidrato de la base ( $BH^+$ ) y de la base en la mezcla de APIs correspondientes. Los protones que son transferidos de la base al ácido se identifican y su desplazamiento químico se introduce en la Ecuación 1.

$$B(\%) = (\delta B_{APIs} - \delta BH^+) / (\delta B - \delta BH^+)$$

Ecuación 1. Porcentaje de base no ionizada (B).

En la Tabla 17 se representan dos ejemplos significativos de las dos situaciones anteriormente descritas, diclofenaco de lidocaína (que denominaremos lidocaína-diclofenaco sin presuponer si es un complejo o una sal) y sacarinato de lidocaína que se comportan como complejo y sal iónica en disolución, respectivamente.

Combinación API	RMN de protón	$\delta B$ (ppm)	$\delta B_{API}$ (ppm)	$\delta BH^+$ (ppm)	%B (Complejo)	% Sal	K
Lidocaína-diclofenaco	$N(\underline{CH_2}CH_3)_2$	2.60	2.64	3.23	94	6	0.1
	$N\underline{CH_2}CONH$	3.12	3.18	4.24			
Lidocaína-sacarinato	$N(\underline{CH_2}CH_3)_2$	2.60	3.19	3.23	8	92	11.5
	$N\underline{CH_2}CONH$	3.12	4.14	4.24			

Tabla 17. Cálculo del porcentaje de sal y complejo en combinaciones de APIs de lidocaína.

Para el estudio de lidocaína diclofenaco se han comparado los espectros de protón de clorhidrato de lidocaína, lidocaína y lidocaína-diclofenaco. Las principales diferencias se encontraron en dos señales de protón a campo bajo,  $N(\underline{CH_2}CH_3)_2$  y  $N\underline{CH_2}CONH$ , ambas señales corresponden a los metilenos cercanos al nitrógeno que será protonado por la base en el proceso de transferencia. En esta combinación el 94 % se comporta como complejo (% B) y

sólo un 6 % está ionizado, resultando una K (sal/complejo) de 0.1. Por otro lado, el estudio de sacarinato de lidocaína reflejó que el 92 % se comporta como sal iónica y un 8 % como complejo.

Como se observa la Tabla 18, se ha llevado a cabo el estudio de una variedad de combinaciones de APIs. Se resumen los porcentajes de sal iónica o complejo calculados incluyendo los valores de  $pK_a$  de los ácidos y bases utilizados. El orden de basicidad aumenta de abajo a arriba en la columna y la acidez de derecha a izquierda.

		acidez ( $pK_a$ )						
		docusato 1.68	acesulfamato 2.00	sacarinato 2.32	Ácido salicílico 3.00	flurbiprofen 3.80	Ácido flufenámico 3.90	diclofenaco 4.01
basicidad ( $pK_a$ )	metformina 12.40	10.7 99% 1% 99.0	10.4	10.1	9.4 99% 1% 99.0	8.6 99% 1% 99.0	8.5 99% 1% 99.0	8.4 99% 1% 99.0
	bupivacaína 8.10	6.4 89% 11% 8.1	6.1 90% 10% 9.0	5.8 93% 7% 13.3	5.1 29% 71% 0.4	4.3 1% 99% 0.01	4.2 1% 99% 0.01	4.1 15% 85% 0.2
	lidocaína 7.91	6.2 96% 4% 24	5.9 86% 12% 7.2	5.6 92% 8% 12.2	4.9 78% 22% 3.5	4.1 1% 99% 0.01	4.0 16% 84% 0.2	3.9 6% 94% 0.1
	prilocaina 7.89	6.2 96% 4% 99	5.9 99% 1% 99	5.6 99% 1% 99	4.9 99% 1% 99	4.1 99% 1% 99	4.0 99% 1% 99	3.9 99% 1% 99
		$\Delta pK_a$ Sal Complejo K						

Tabla 18. Porcentajes de sales y complejos en las combinaciones de APIs propuestas.

Una de los parámetros más utilizadas en el diseño de ILs prácticos es el  $\Delta pK_a$ , Miran *et al*/ publicaron el estudio de una variedad de ILs prácticos basados en 1,8-diazabicycloundec-7-eno (DBU), y concluyeron que la ionicidad aumentaba hasta un  $\Delta pK_a = 15$  y después se invertía esa tendencia. Como se observa en la tabla x, todas las combinaciones de APIs sintetizadas presentan un  $pK_a = 10.7 - 3.9$  y han mostrado grados de ionización totalmente independientes de dicho  $\Delta pK_a$ . Por ejemplo, tanto prilocaína diclofenaco como lidocaína diclofenaco presentan un  $\Delta pK_a = 3.9$  pero su comportamiento en disolución es totalmente diferente, siendo sal iónica y complejo respectivamente.

A lo largo del estudio en disolución se ha observado como, independientemente de la acidez y basicidad, uno de los factores importantes en la formación de complejos es la base de Brønsted. Por ejemplo, tanto las combinaciones de metformina como de prilocaína conducen a ILs prácticos con un porcentaje alto de ionicidad. Por otro lado, la formación de sales iónicas o complejos con los anestésicos locales bupivacaína o lidocaína depende del ácido de Brønsted utilizado. Las combinaciones con diclofenaco, flufenámico y flurbiprofen han dado a lugar a la formación de complejos con ambas bases. Por el contrario, la combinación de lidocaína o bupivacaína con ácidos más fuertes como por ejemplo docusato, permiten la formación de sales iónicas en disolución.

### 2.2.5. FARMACOLOGÍA

Si bien, en los últimos años, se han publicado ejemplos de ILs formados por dos principios activos, los denominados ILs-APIs, existen relativamente menos datos acerca de la farmacología de dichos compuestos.

Uno de los campos más estudiados es el de los antimicrobianos donde es creciente el número de publicaciones que tratan sobre la actividad frente a diferentes microorganismos de algunos ILs, y así, por ejemplo un trabajo reciente se describe la actividad antifúngica y antibacteriana de una serie de derivados de imidazolio y triazolio.<sup>103</sup> Algunos otros ejemplos de ILs con actividad biológica se ha mencionado ya en la introducción de este capítulo si bien mayoritariamente se refieren a ensayos *in vitro*.

En lo que respecta a pruebas *in vivo* el grupo de Roger<sup>104</sup> ha comparado el comportamiento de la lidocaína docusato (**54**), con el correspondiente hidrocloreto de lidocaína. Se ha demostrado que lidocaína docusato, compuesto hidrófobo y líquido a temperatura ambiente, tiene distinta solubilidad, mayor estabilidad térmica y es mejor analgésico tópico en dos modelos animales de antinocicepción. Además, se encontraron diferencias entre ambos fármacos a nivel celular lo que sugiere un mecanismo de acción distinto. Este es un buen ejemplo de cómo las propiedades fisicoquímicas que resultan de la formación de los ILs pueden afectar a la actividad biológica.

---

<sup>103</sup> Borowiecki, P.; Milner-Krawczyk, M.; Pleniewicz, J. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2013**, 9, 516.

<sup>104</sup> Hough, W. L.; Smiglak, M.; Rodríguez, H.; Swatloski, R. P.; Spear, S. K.; Daly, D. T.; Pernak, J.; Grisel, J. E.; Carliss, R. D.; Soutullo, M. D. *New Journal of Chemistry* **2007**, 31, 1429.

En esta memoria, para llevar a cabo los primeros ensayos farmacológicos *in vivo* de los ILs se seleccionaron los derivados de metformina, **69** y **75**. El hidrocloreuro de metformina es el fármaco más utilizado para el tratamiento de la diabetes tipo 2, siendo esta uno de los trastornos principales del síndrome metabólico. Uno de los problemas asociados a la metformina es su baja y lenta absorción tras su administración oral. La causa principal es que la metformina se encuentra totalmente protonada a pH fisiológico, además su excreción es rápida, tiene una mala biodisponibilidad y produce efectos secundarios gastrointestinales. Ante esta situación, se están investigando análogos de metformina con el fin de eliminar sus propiedades negativas, y una de las soluciones es el diseño de profármacos.<sup>105</sup>

Se ha realizado el ensayo agudo de tolerancia de glucosa de los derivados **69** y **75** en modelos de ratas Zucker obesas y diabéticas. Estos ensayos se han llevado a cabo en el Laboratorio de Medicina Regenerativa del hospital Carlos Haya de Málaga, en colaboración con el Dr. Fernando Rodríguez de Fonseca. Como se observa en la Figura 56 tras el tratamiento con ambos derivados la concentración de glucosa aumenta durante los 10, 15 y 30 min de ensayo, y a continuación comienza a bajar. En ambos casos la bajada de concentración de glucosa no es mucho más brusca que en el caso del vehículo. En esta situación es necesario llevar a cabo los ensayos crónicos del derivado **75**, el cual ha mostrado una disminución de la concentración de glucosa más marcada. De esta forma se podría confirmar que el comportamiento de **75** consistiría en una

---

<sup>105</sup> Huttunen, K. M.; Leppänen, J.; Kemppainen, E.; Palonen, P.; Rautio, J.; Järvinen, T.; Vepsäläinen, J. *Synthesis* **2008**, 2008, 3619.



primera etapa diabetogénica seguida de una progresiva inhibición de la gluconeogénesis.

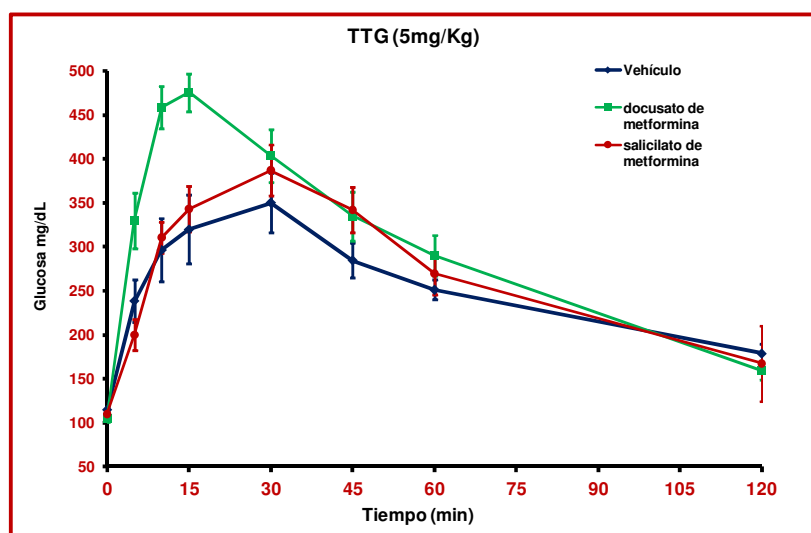


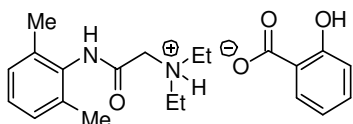
Figura 56. Ensayos de tolerancia de glucosa de los derivados **69** y **75**.

### 2.3. CONCLUSIONES

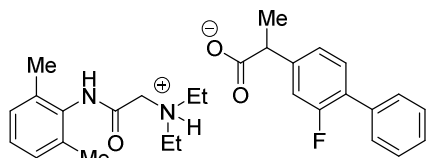
- Se han sintetizado 28 combinaciones de APIS, de las cuales 22 se comportan como ILs y 6 como sales sólidas.
- Se ha estudiado su comportamiento térmico utilizando TGA y DSC.
- Se ha puesto a punto un método para el estudio del grado de ionicidad en disolución por RMN.
- Entre los distintos ILs sintetizados cabe destacar los derivados de metformina:
  - El salicilato de metformina es un co-cristal con un comportamiento térmico inusual.
  - El docusato de metformina es un IL con una actividad farmacológica interesante.

## 2.4. PARTE EXPERIMENTAL

Procedimiento general para la síntesis de ILs de lidocaína como se ilustra con el caso de **salicilato de lidocaína (48)**.

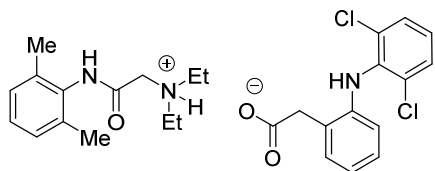


Una mezcla de clorhidrato de lidocaína (1.0 g, 3.47 mmol) y salicilato sódico (0.56 g, 3.47 mmol) en acetona/H<sub>2</sub>O (1:1) (6.2 mL) se agita durante 12 h a t.a. El disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se disuelve en H<sub>2</sub>O y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los extractos orgánicos se lavan con H<sub>2</sub>O hasta no detectar iones cloruro en los lavados (test de adición de una solución de AgNO<sub>3</sub>). Finalmente, los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose **48** como un líquido (0.53 g, 45 %). <sup>1</sup>H RMN: (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 9.90 (sa, 1H, NH), 7.70 (dd, *J*= 7.6, 1.1 Hz, 1H, H-Ar), 7.23 (m, 1H, H-Ar), 7.08 (s, 3H, H-Ar), 6.65-6.72 (m, 2H, H-Ar), 3.89 (s, 2H, CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>), 3.05 (c, *J*= 7.2 Hz, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 2.15 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>-Ar), 1.19 (t, *J*= 7.2 Hz, 6H, 2CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN: (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 171.9 (CO), 165.3 (NHCO), 162.2, 135.1, 134.2 (2C), 132.7, 130.1, 127.8 (2CH-Ar), 126.8, 118.2, 1170.1, 116.2, 53.7 (COCH<sub>2</sub>), 48.3 (2CH<sub>2</sub>), 18.1 (2CH<sub>3</sub>-Ar), 9.9 (2CH<sub>3</sub>). IR: ν 3195, 2980, 1688, 1629, 1592, 1486, 1461, 1384, 1255, 1140, 859, 762, 667 cm<sup>-1</sup>. Análisis teórico C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C, 67.72; H, 7.58; N, 7.52. Experimental: C, 67.65; H, 7.27; N, 7.34.

**Lidocaína-Flurbiprofen (49)**

Clorhidrato de lidocaína (0.24 g, 0.82 mmol).

Flurbiprofen sódico (0.22 g, 0.82 mmol). **49** como un líquido (0.32 g, 82 %).  $^1\text{H}$  RMN: (300 MHz,  $-\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9.15 (bs, 1H, NH), 7.39-7.54 (m, 6H, H-Ar), 7.11-7.36 (m, 2H, H-Ar), 7.05 (s, 3H, H-Ar), 3.76 (c,  $J = 7.3\text{ Hz}$ , 1H, CH), 3.12 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}^+$ ), 2.61 (c,  $J = 7.2\text{ Hz}$ , 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2.12 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-Ar}$ ), 1.40 (d,  $J = 7.0\text{ Hz}$ , 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.06 (t,  $J = 7.1\text{ Hz}$ , 6H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN: (75 MHz,  $d_6\text{-DMSO}$ )  $\delta$  (ppm) 174.8 (CO), 169.9 (NHCO), 158.8 (d,  $J = 245\text{ Hz}$ , CF), 143.1, 135.2, 135.1 (2CH-Ar), 135.07, 134.86, 134.2, 130.6, 128.7, 128.6 (2CH-Ar), 127.8, 127.6 (2CH-Ar), 126.3, 124.0, 115.1, 56.8 ( $\text{COCH}_2$ ), 48.0 ( $2\text{CH}_2$ ), 44.1 (CH), 18.2 ( $\text{CH}_3$ ), 18.1 ( $2\text{CH}_3\text{-Ar}$ ), 12.1 ( $2\text{CH}_3$ ). IR:  $\nu$  3271, 2972, 2932, 1688, 1581, 1484, 1418, 1387, 1268, 1202, 1131, 925, 767, 698  $\text{cm}^{-1}$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{FN}_2\text{O}_3$ : C, 72.78; H, 7.37; N, 5.85. Experimental: C, 72.59; H, 7.22; N, 6.03.

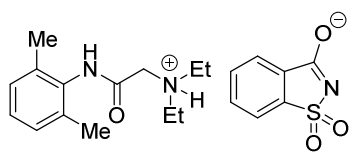
**Lidocaína-diclofenaco (50)**

Clorhidrato de lidocaína (1.00 g, 3.47 mmol).

Diclofenaco sódico (1.10 g, 3.47 mmol). **50** como un líquido (1.02 g, 56 %).  $^1\text{H}$  RMN: (300 MHz,  $-\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9.19 (sa, 1H, NHCO), 7.51 (d,  $J = 8\text{ Hz}$ , 2H, H-Ar), 7.38 (sa, 1H, NH-Ar), 7.07-7.20 (m, 2H, H-Ar), 7.05 (s, 4H, H-Ar), 6.85 (td,

$J = 7.4, 1.3 \text{ Hz}$ , 1H, H-Ar), 6.28 (dd,  $J = 8.1, 1.2 \text{ Hz}$ , 1H, H-Ar), 3.67 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.18 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}^+$ ), 2.64 (c,  $J = 7.2 \text{ Hz}$ , 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2.12 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{-Ar}$ ), 1.07 (t,  $J = 7.1 \text{ Hz}$ , 6H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN: (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm) 173.4 (CO), 169.2 (NHCO), 142.7, 135.1, 137.2 (2C), 130.8, 129.9, 129.2 (2CH-Ar), 127.6 (2CH-Ar), 127.4, 126.3, 125.4, 124.2, 120.7, 115.9, 56.6 ( $\text{COCH}_2$ ), 48.0 (2 $\text{CH}_2$ ), 38.1 ( $\text{CH}_2\text{-Ar}$ ), 18.1 (2 $\text{CH}_3\text{-Ar}$ ), 11.9 (2 $\text{CH}_3$ ). IR:  $\nu$  3256, 2971, 2923, 1689, 1577, 1504, 1453, 1376, 1302, 1196, 1162, 1093, 979, 770, 746, 715  $\text{cm}^{-1}$ . Análisis teórico  $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_3$ : C, 63.39; H, 6.27; N, 7.92. Experimental: C, 63.11; H, 6.00; N, 8.20.

### Sacarinato de lidocaína (51)



Clorhidrato de lidocaína (0.10 g, 0.35 mmol).

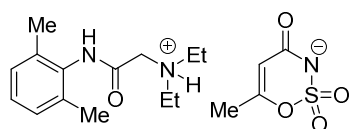
Sacarinato sódico hidratado (0.07 g, 0.35 mmol). **51** como líquido (0.11 g, 73 %).

$^1\text{H}$  RMN: (300 MHz,  $d_6\text{-DMSO}$ )  $\delta$  (ppm) 9.93 (sa, 1H,  $^+\text{NH}$ ), 9.51 (sa, 1H, NH), 7.64-7.66 (m, 2H, H-Ar), 7.56-7.60 (m, 2H, H-Ar), 7.12 (sa, 3H, H-Ar), 4.14 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.19 (c,  $J = 7.2 \text{ Hz}$ , 4H, 2 $\text{CH}_2$ ), 2.17 (s, 6H, 2 $\text{CH}_3$ ), 1.24 (t,  $J = 7.1 \text{ Hz}$ , 6H, 2 $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN: (75 MHz,  $d_6\text{-DMSO}$ )  $\delta$  (ppm) 168.1 (CN), 164.1 (CO), 145.6, 135.4 (CH-Ar), 135.1, 134.0, 131.9 (CH-Ar), 131.4 (CH-Ar), 128.3 (CH-Ar), 127.4 (2C), 122.9 (CH-Ar), 119.5 (CH-Ar), 53.3 ( $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 48.9 (2 $\text{CH}_2$ ), 18.4 (2 $\text{CH}_3\text{-Ar}$ ), 9.4 (2 $\text{CH}_3$ ). IR:  $\nu$  3259 (NH), 2986, 1693 (CO), 1634 (CO), 1582 ( $\text{C}=\text{C}$ ), 1540, 1472 (C-N), 1278 (C-O), 1147 ( $\text{SO}_2$ ), 950, 770 (C-benceno).

sustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . Análisis teórico  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ : C, 60.41; H, 6.52; N, 10.06.

Experimental: C, 56.83; H, 6.52; N, 9.21; S, 6.51.

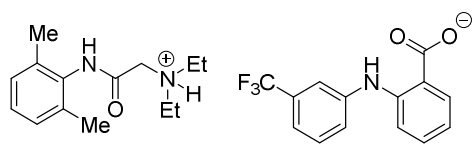
### Lidocaína acesulfamato (52)



Clorhidrato de lidocaína (0.10 g, 0.35 mmol).

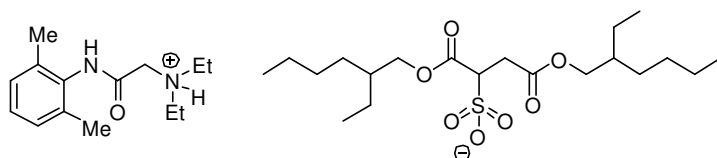
Acesulfamato potásico (0.07 g, 0.35 mmol). **52** como un líquido (0.09 g, 62 %).

$^1\text{H}$  RMN: (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9.89 (sa, 1H, NH), 9.49 (sa, 1H, NH), 7.12 (m, 3H, H-Ar), 5.28 (sa, 1H,  $\text{H}_{\text{vinílico}}$ ), 4.09 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.17 (c,  $J = 7.1$  Hz, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 2.17 (s, 6H,  $2\text{CH}_3$ ), 1.90 (d,  $J = 1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3_{\text{vinílico}}$ ), 1.24 (t,  $J = 7.2$  Hz, 6H,  $2\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN: (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 168.2 (CO), 164.4 (NCO), 160.1 ( $\text{C}\beta$ ), 135.4 (2C), 134.1, 128.3, 127.4 ( $2\text{CH-Ar}$ ), 102.4 ( $\text{C}\alpha$ ), 53.5 ( $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 48.8 ( $2\text{CH}_2$ ), 19.8 ( $\text{CH}_3$ ), 18.4 ( $2\text{CH}_3\text{-Ar}$ ), 9.5 ( $2\text{CH}_3$ ). IR:  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3217 (NH), 2986, 2923 ( $\text{CH-Ar}$ ), 1689 (CO), 1652 (CO), 1558 ( $\text{SO}_2$ ), 1475 (C-N), 1174 (CON), 940, 778 (C-benceno sustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . Análisis teórico  $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ : C, 54.39; H, 6.85; N, 10.57. Experimental: C, 54.10; H, 7.12; N, 10.28; S, 7.80.

**Sal de lidocaína-flufenámico (53)**

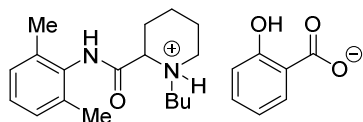
Clorhidrato de lidocaína monohidratada (0.08

g, 0.30 mmol). Flufenámico sódico (0.09 g, 0.90 mmol). **53** como un líquido (0.04 g, 28 %). P.f. 90.1 °C.  $^1\text{H}$  RMN: (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9.36 (sa, 1H, NH), 7.96 (dd,  $J = 7.9, 1.1$  Hz, 1H, H-Ar), 7.49-7.52 (m, 3H, H-Ar), 7.41 (m, 1H, H-Ar), 7.29-7.32 (m, 2H, H-Ar), 7.07 (s, 3H, H-Ar), 6.87 (ddd,  $J = 8.0, 7.0, 1.2$  Hz, 1H, H-Ar), 3.29 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.71 (q,  $J = 7.1$  Hz, 4H,  $2\text{CH}_2$ ), 2.14 (s, 6H,  $2\text{CH}_3\text{-Ar}$ ), 1.11 (t,  $J = 7.1$  Hz, 6H,  $2\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN: (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm) 170.4 (CO), 168.8 (NCO), 145.4, 142.8, 135.5, 135.3, 133.6, 132.4, 131.2, 130.9, 130.8, 130.2 (c,  $J = 30$  Hz, C $\alpha$ ), 128.0, 126.8, 124.5 (c,  $J = 272.1$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 123.4, 119.1, 118.3, 117.0 (c,  $J = 3.8$  Hz, C $\beta$ ), 115.9 (c,  $J = 3.8$  Hz, C $\beta$ ), 115.1, 56.3 ( $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 48.4 ( $2\text{CH}_2$ ), 18.5 ( $2\text{CH}_3\text{-Ar}$ ), 11.9 ( $2\text{CH}_3$ ). IR:  $\nu$  3205 (NH), 2981 (CH-Ar), 1690 (CO), 1608 (C=C), 1583 (CO), 1517 (C-N), 1462 (C-N), 1364 (CH), 1336 (C-O), 1170, 1114 ( $\text{CF}_3$ ), 758 (C-benceno sustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$ : C, 65.23; H, 6.26; N, 8.15. Experimental: C, 65.10; H, 6.08; N, 8.43.

**Docusato de lidocaína<sup>106</sup> (54)**<sup>1</sup>H RMN: (300 MHz, *d*<sub>6</sub>-

DMSO)  $\delta$  (ppm) 7.15 – 7.00 (m, 3H, H-Ar), 4.20 (s, 2H), 3.78 – 3.68 (m, 4H), 3.53 – 3.40 (m, 1H), 3.24 – 3.11 (m, 4H), 3.01 – 2.99 (m, 1H), 2.88 – 2.70 (m, 1H), 2.17 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 1.48 – 1.39 (m, 2H), 1.25 – 1.12 (m, 22H), 0.86 – 0.83 (m, 12H). <sup>13</sup>C RMN: (75 MHz, *d*<sub>6</sub>-DMSO)  $\delta$  (ppm) 170.8, 168.1, 134.6, 133.2, 127.6, 127.0, 126.4, 73.2, 66.0, 61.2, 60.1, 49.0, 38.2, 34.5, 30.0, 29.6, 29.1, 28.0, 25.1, 24.1, 23.3, 23.0, 22.7, 22.1, 19.2, 17.9, 14.0, 11.7, 11.0, 8.5.

Procedimiento general para la síntesis de ILs de bupivacaína como se ilustra con el caso de **bupivacaína salicilato (55)**.



La mezcla de clorhidrato de bupivacaína (0.16 g, 0.5

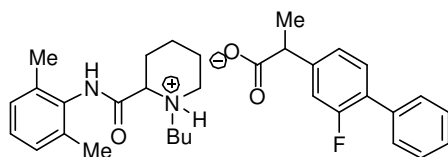
mmol) y salicilato sódico (0.08 g, 0.5 mmol) en acetona/H<sub>2</sub>O (1:1) (6.2 mL) se agita durante 12 h a t.a. El disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se disuelve en H<sub>2</sub>O y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los extractos orgánicos se lavan con H<sub>2</sub>O hasta no detectar iones cloruro en los lavados (test de adición de una solución de AgNO<sub>3</sub>). Finalmente, los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose **55** como un líquido

<sup>106</sup> Hough, W. L.; Smiglak, M.; Rodríguez, H.; Swatloski, R. P.; Spear, S. K.; Daly, D. T.; Pernak, J.; Grisel, J. E.; Carliss, R. D.; Soutullo, M. D. *New Journal of Chemistry* **2007**, 31, 1429.



(0.15 g, 56 %).  $^1\text{H}$  RMN: (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 10.05 (sa, 1H, NH), 7.71 (m, 3H, H-Ar), 7.24 (m, 2H, H-Ar), 7.11 (s, 4H, H-Ar), 6.65-6.73 (m, 2H, H-Ar), 3.84 (sa, 1H, CH), 3.44 (d,  $J=11.9$  Hz, 1H, CH), 2.82-2.99 (m, 3H,  $\text{CH}_2/\text{CH}$ ), 2.15 (sa, 7H,  $2\text{CH}_3\text{-Ar/CH}$ ), 1.59-1.88 (m, 6H,  $3\text{CH}_2$ ), 1.30 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 0.89 (t,  $J=7.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR: (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 172.1 (CO), 168.3 (CON), 162.7, 135.4 (2C), 134.4, 132.9, 130.4, 128.3, 127.3, 118.8, 117.2, 116.5, 65.5 (CH), 55.3 ( $\text{CH}_2$ ), 51.4 ( $\text{CH}_2$ ), 29.4, 26.1, 23.2, 21.9, 20.0, 18.3 ( $2\text{CH}_3\text{-Ar}$ ), 13.9 ( $\text{CH}_3$ ). IR:  $\nu$  3194 (NH), 2961 ( $\text{CH}_{\text{alquilo}}$ ), 1682 (CO), 1627 (CO), 1591 (C-N), 1457 (C-N), 1384 (C-O), 1257 (C-O), 761 (C-benceno sustituido)  $\text{cm}^{-1}$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4$ : C, 70.39; H, 8.03; N, 6.57. Experimental: C, 70.11; H, 7.88; N, 6.51.

### Bupivacaína-flurbiprofen (56)



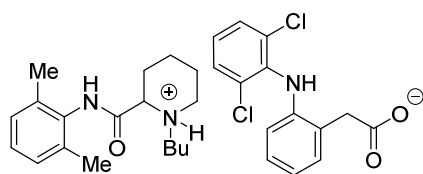
Clorhidrato de Bupivacaína (0.10 g, 0.3

mmol). Flurbiprofen sódico (0.08 g, 0.3 mmol). **56** como un líquido (0.13 g, 83 %).

$^1\text{H}$  RMN: (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 9.10 (sa, 1H, NH), 7.37-7.56 (m, 6H, H-Ar), 7.21-7.25 (m, 2H, H-Ar), 7.06 (s, 3H, H-Ar), 3.77 (c,  $J=7.1$  Hz, 1H, CH), 3.11 (m, 1H), 2.87 (m, 1H), 2.60-2.69 (m, 1H), 2.19-2.28 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.13 (s, 6H,  $2\text{CH}_3\text{-Ar}$ ), 2.03 (m, 1H), 1.48-1.86 (m, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 1.41 (d,  $J=7.2$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.21-1.32 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 0.88 (t,  $J=7.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN: (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 175.3 (CO), 172.2 (CO), 159.2 (d,  $J=246$  Hz, CF), 143.6 (d,  $J=7.7$

Hz, C $\beta$ ), 135.7, 135.4, 135.3 (2C), 134.0, 131.0, 129.1 (d,  $J$ = 7.7 Hz, C $\beta$ ), 128.9 (2CH-Ar), 128.1, 128.0, 127.0 (d,  $J$ = 13.2 Hz, C $\alpha$ ), 126.7, 124.4, 115.5, 67.8 (CH<sub>bupiv.</sub>), 56.2, 51.4 (CH<sub>2</sub>N), 44.5 (CH<sub>flurb.</sub>), 30.5 (CH<sub>2</sub>), 28.6, 25.2, 23.4, 20.6, 18.6 (2CH<sub>3</sub>-Ar), 18.5 (CH<sub>3</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>). IR:  $\nu$  3245 (NH), 2959 (CH<sub>alquilico</sub>), 1687 (CO), 1484 (C=C), 1418 (C=C), 1382 (C-O), 1269 (C-O), 1012 (CF), 767, 699 (C-benceno sustituido) cm<sup>-1</sup>. Análisis elemental teórico: C<sub>33</sub>H<sub>41</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: C, 74.41; H, 7.76; N, 5.26. Experimental: C, 74.25; H, 7.74; N, 5.12.

### Bupivacaína-diclofenaco (57)

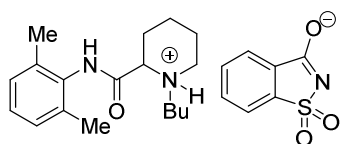


Clorhidrato de Bupivacaína (0.16 g, 0.5 mmol).

Diclofenaco sódico (0.16, 0.5 mmol). **57** como un líquido (0.13 g, 43 %). <sup>1</sup>H RMN: (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 10.05 (sa, 1H, NH), 7.71 (m, 3H, H-Ar), 7.24 (m, 2H, H-Ar), 7.11 (s, 3H, H-Ar), 6.65-6.73 (m, 2H, H-Ar), 3.84 (sa, 2H), 3.44 (m, 1H, CH), 2.82-2.99 (m, 3H, CH<sub>2</sub>/CH), 2.15 (sa, 7H, 2CH<sub>3</sub>-Ar/CH), 1.59-1.88 (m, 8H), 1.30 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.88 (t,  $J$ = 7.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN: (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 175.1, 172.1 (CO), 168.3, 162.7, 142.7, 137.2, 135.4, 134.4 (2CH-Ar), 132.9, 130.4, 129.0 (2CHAr), 128.3 (2CH-Ar), 127.3, 123.8, 118.8, 117.2, 116.5, 65.5 (CH), 55.3 (CH<sub>2</sub>), 51.4 (CH<sub>2</sub>), 29.4, 26.1, 23.2, 21.9, 20.0, 18.3 (2CH<sub>3</sub>-Ar), 13.9 (CH<sub>3</sub>). IR:  $\nu$  3252 (NH), 2961 (CH<sub>alquilico</sub>), 1689 (CO), 1577 (CO), 1505 (C-N), 1453 (C-N), 746 (C-benceno sustituido) cm<sup>-1</sup>. Análisis elemental teórico

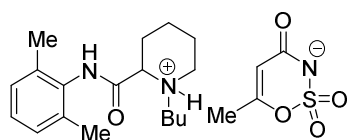
$C_{32}H_{39}Cl_2N_3O_3$ : C, 65.75; H, 6.72; N, 7.19. Experimental: C, 65.58; H, 6.97; N, 6.99.

### Sacarinato de bupivacaína (58)



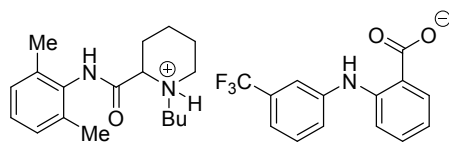
Clorhidrato de bupivacaína (0.10, 0.31 mmol).

Sacarinato sódico (0.06 g, 0.31 mmol). **58** como un líquido (0.11 g, 75 %).  $^1H$  RMN: (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 10.23 (s, 1H, NH), 9.70 (sa, 1H, NH), 7.57-7.68 (m, 4H, H-Ar<sub>sacarinato</sub>), 7.14 (s, 3H, H-Ar), 4.15 (sa, 1H, CH), 3.50-3.54 (m, 1H, CH), 3.02-3.10 (m, 3H, CH/CH<sub>2</sub>), 2.23-2.31 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.16 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>-Ar), 1.68-1.80 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 1.31 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.89 (t,  $J$ = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).  $^{13}C$  RMN: (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 168.2 (CN), 166.9 (CO), 145.6 (C-Ar), 135.3 (2C), 135.0, 133.8, 132.0, 131.5, 128.4 (2CH-Ar), 127.6, 122.9, 119.5, 65.3 (CH), 55.3, 51.7 (CH<sub>2</sub>N), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 25.2, 22.5, 21.5, 19.8, 18.3 (2CH<sub>3</sub>-Ar), 13.8 (CH<sub>3</sub>). IR:  $\nu$  3253 (NH), 2962 (CH<sub>alkyl</sub>), 1632 (C=O), 1582 (C=C), 1539 (amide group), 1456 (C-N), 1278 (C-O), 1146 (SO<sub>2</sub>)  $cm^{-1}$ . Análisis elemental teórico  $C_{25}H_{33}N_3O_4S$ : C, 63.67; H, 7.05; N, 8.91. Experimental: C, 63.43; H, 7.07; N, 8.97.

**Acesulfamato de bupivacaína (59)**

Clorhidrato de bupivacaína (0.10 g, 0.31 mmol).

Acesulfamato potásico (0.062 g, 0.31 mmol). **59** como un líquido (0.10 g, 74.7 %).  $^1\text{H}$  RMN: (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 10.16 (s, 1H, NH), 9.69 (sa, 1H, NH), 7.13 (s, 3H, H-Ar), 5.28 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{vinílico}}$ ), 4.09 (sa, 1H, CH), 3.50 (sa, 1H, CH), 3.07 (sa, 3H, CH/CH<sub>2</sub>), 2.22 – 2.37 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.16 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>-Ar), 1.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.69 – 1.83 (m, 6H, CH<sub>2</sub>), 1.30 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.90 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  168.2 (CO), 167.0 (CO), 160.1 (C $\beta$ ), 135.3 (2C), 133.9, 128.4 (2CH-Ar), 127.6, 102.4 (C $\alpha$ ), 65.4 (CH), 55.0, 51.6 (CH<sub>2</sub>N), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 25.2, 22.5, 21.6, 19.9, 19.8 (CH<sub>3</sub>), 18.3 (2CH<sub>3</sub>-Ar), 13.8 (CH<sub>3</sub>). IR:  $\nu$  3273 (NH), 2961 (CH<sub>alquílico</sub>), 1687 (CO), 1646 (CO), 1568 (grupo amida), 1472 (C-N), 1171 (NCO)  $\text{cm}^{-1}$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ : C, 58.51; H, 7.37; N, 9.31. Experimental: C, 58.84; H, 7.98; N, 9.83.

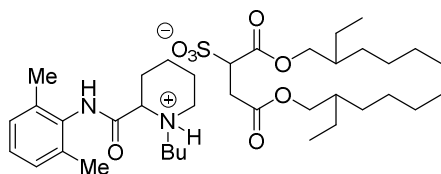
**Bupivacaína-flufenámico (60)**

Clorhidrato de bupivacaína (0.10 g, 0.31 mmol).

Sal de sodio del ácido Flufenámico (0.09 g, 0.31 mmol). **60** como un líquido (0.17 g, 95 %).  $^1\text{H}$  RMN: (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9.34 (s, 1H, NH), 7.95 (dd,  $J = 7.9, 1.7$ , 1H, H-Ar), 7.29 – 7.56 (m, 6H, H-Ar), 7.07 (s, 3H, H-Ar), 6.87

(ddd,  $J = 8.1, 7.1, 1.2$ , 1H, H-Ar), 3.10 – 3.20 (m, 2H, 2CH), 2.67 – 2.76 (m, 1H, CH), 2.32 – 2.44 (m, 1H, CH), 2.18 – 2.25 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.91 – 1.94 (m, 1H, CH), 1.46 – 1.80 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 1.19 – 1.39 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 0.80 (t, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR: (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  171.2 (CO), 170.2, 145.5 (C-Ar), 142.7, 135.6 (2C), 135.2, 133.7, 132.3, 130.9 (c,  $J = 30.1$  Hz, C $\alpha$ ), 128.3 (c,  $J = 275$  Hz, CF<sub>3</sub>), 128.1 (2CH-Ar), 126.9, 123.5, 118.4 (c,  $J = 4$  Hz, C $\beta$ ), 116.8 (c,  $J = 4$  Hz, C $\beta$ ), 116.1, 68.9 (CH/CH<sub>2</sub>), 67.3, 56.2, 56.0, 51.4, 32.5 (CH<sub>2</sub>), 30.0, 28.0, 24.7, 23.1, 18.4, (2CH<sub>3</sub>-Ar), 14.2 (CH<sub>3</sub>). IR:  $\nu$  3191 (NH), 2961 (CH<sub>alkyl</sub>), 1683 (CO), 1583 (CO), 1514 (CH-Ar), 1335 (C-O), 1286 (C-O), 1164, 1125 (CF<sub>3</sub>), 753 (C-benceno sustituido) cm<sup>-1</sup>. Análisis elemental teórico C<sub>32</sub>H<sub>38</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: C, 67.47; H, 6.72; N, 7.38. Experimental: C, 66.42; H, 6.29; N, 7.00.

### Bupivacaína docusato (61)



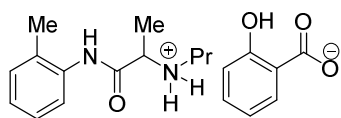
Clorhidrato de bupivacaína (0.10 g, 0.39

mmol). Docusato sódico (0.17 g, 0.39 mmol). **61** como un líquido (0.18 g, 72 %).

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.10 (sa, 1H, NH), 9.67 (sa, 1H, NH), 7.12 (m, 3H, H-Ar), 4.10 (t,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 3.90 – 3.82 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>O), 3.65 (dd,  $J = 11.3, 3.8$  Hz, 1H, CH), 3.53 (d,  $J = 12.1$  Hz, 1H), 3.19 – 2.96 (m, 2H), 2.98 – 2.73 (m, 2H), 2.16 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>-Ar), 1.94 – 1.66 (m, 6H, 3CH<sub>2</sub>), 1.59 – 1.43 (m, 4H), 1.43 – 1.15 (m, 18H, 9CH<sub>2</sub>), 0.97 – 0.76 (m, 15H, 5CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz,

DMSO- $d_6$ )  $\delta$  169.9 (CO), 167.2 (CO), 165.3 (CONH), 135.2 (2C), 134.2, 133.8 (CH<sub>3</sub>-C-Ar), 132.3 (NH-C-Ar), 126.9 (2CH-Ar), 126.4 (CH-Ar), 65.0 (CH<sub>2</sub>O), 64.9 (CH<sub>2</sub>O), 60.3 (CHSO<sub>3</sub>), 53.5, 50.2, 37.0, 33.0, 28.6, 28.4, 27.6, 27.2, 23.7, 22.1, 21.9, 21.3, 21.0 (2CH<sub>3</sub>-Ar), 20.0, 18.3, 16.8, 12.8, 12.3, 9.6 (2CH<sub>3</sub>). Análisis elemental teórico C<sub>38</sub>H<sub>66</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S: C, 64.19; H, 9.36; N, 3.94. Experimental: C, 64.35; H, 9.36; N, 3.85.

Procedimiento general para la síntesis de ILs de prilocaína como se ilustra con el caso de **prilocaína salicilato (62)**.

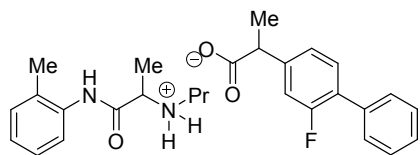


Clorhidrato de prilocaína (0.10 g, 0.39 mmol) y

salicilato sódico (0.06 g, 0.39 mmol) se disuelven en 10 mL de acetona/H<sub>2</sub>O 1:1 y la mezcla de reacción se agita durante 12 h a t.a. El disolvente se elimina a presión reducida y el residuo se disuelve en 4 mL de H<sub>2</sub>O y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL). Los extractos orgánicos se lavan sucesivamente con H<sub>2</sub>O (10 mL) hasta no detectar iones cloruro en los lavados (test de adición de una solución de AgNO<sub>3</sub>). Finalmente, los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose **62** como un sólido blanco (0.013 g, 9.4 %). P.f. 159 °C. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.92 (s, 1H), 7.66 (dd,  $J$  = 7.6, 1.9 Hz, 1H, H-Ar), 7.47 – 7.36 (m, 1H, H-Ar), 7.31 – 7.12 (m, 4H, H-Ar), 6.71 – 6.58 (m, 2H, H-Ar), 3.96 (m, 1H, CH<sub>3</sub>CH), 2.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ar), 2.77 – 2.97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.64 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.50 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH), 0.93 (t,  $J$

= 7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 172.4 (CO), 168.8 (CO), 162.8, 136.5, 132.3, 131.3, 130.8, 130.4, 126.5, 126.3, 125.5, 119.7, 116.9, 116.3, 56.0 (CH), 47.5 (CH<sub>2</sub>N), 19.9 (CH<sub>2</sub>), 18.1 (CH<sub>3</sub>-Ar), 16.9 (CH<sub>3</sub>), 11.4 (CH<sub>3</sub>). IR: ν 3435, 3236, 3064, 2970, 2939, 2880, 1662, 1626, 1591, 1485, 1456, 1380, 1255, 755 cm<sup>-1</sup>. Análisis elemental teórico C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: C, 67.02; H, 7.31; N, 7.82. Experimental: C, 66.78; H, 7.09; N, 7.75.

### Prilocaina flurbiprofen (63)

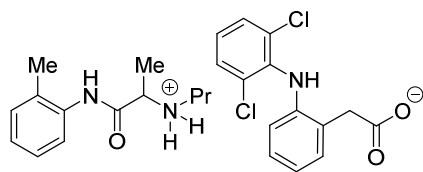


Clorhidrato de prilocaina (0.07 g, 0.26 mmol).

Flurbiprofen sódico (0.07 g, 0.26 mmol). **63** como un líquido (0.12 g, 95 %). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 9.66 (s, 1H), 7.66 (dd, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 1H, H-Ar), 7.58 – 7.44 (m, 5H, H-Ar), 7.41 (m, 1H, H-Ar), 7.29 – 7.13 (m, 4H, H-Ar), 7.06 (td, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1H, H-Ar), 3.77 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, CH<sub>prilocaina</sub>), 3.39 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, CH<sub>flurbiprofen</sub>), 2.58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ar), 1.51 (sex, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.41 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3prilocaina</sub>), 1.32 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>3flurbiprofen</sub>), 0.90 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 175.3 (CO), 172.6 (CO), 159.2 (d, *J* = 245.7 Hz, CF), 143.7, 136.3, 135.3, 134.3, 131.0, 130.6, 130.1, 129.1, 128.9, 128.1, 127.0, 126.8, 126.5, 125.0, 124.4 (d, *J* = 3.1 Hz, Cα) 123.3, 115.5 (d, *J* = 23.2 Hz, Cα), 58.0 (CH<sub>pril.</sub>), 49.6 (CHN), 44.6 (CH<sub>flurb.</sub>), 22.5, 18.9 (CH<sub>3</sub>), 18.7, 17.9, 12.0. Análisis elemental teórico

$C_{28}H_{33}FN_2O_3$ : C, 72.39; H, 7.16; N, 6.03. Experimental: C, 72.11; H, 7.15; N, 5.99.

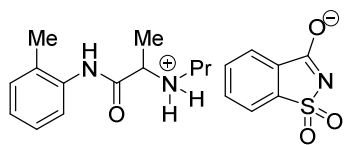
#### Prilocaina - diclofenaco (64)



Clorhidrato de prilocaína (0.10 g, 0.39 mmol).

Diclofenaco sódico (0.12 g, 0.39 mmol). **64** como un sólido blanco (0.16 g, 80 %). P.f. 123 °C.  $^1H$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.66 (sa, 1H, NH), 7.76 (sa, 1H, NH), 7.68 (sa, 1H, NH), 7.51 (d,  $J$ = 8.1 Hz, 2H, H-Ar), 7.14 – 7.23 (m, 4H, H-Ar), 7.04 – 7.09 (m, 2H, H-Ar), 6.84 (td,  $J$ = 7.4, 1.2 Hz, 1H, H-Ar), 6.29 (dd,  $J$ = 8.1, 1.2 Hz, 1H, H-Ar), 3.65 (s, 2H,  $CH_2CO$ ), 3.30 – 3.43 (m, 1H, CH), 2.55 – 2.64 (m, 2H,  $CH_2$ ), 2.21 (s, 3H,  $CH_3$ -Ar), 1.50 (s, 2H,  $CH_2$ ), 1.31 (d,  $J$ = 7.0 Hz, 3H,  $CH_3$ ), 0.90 (t,  $J$ = 7.4 Hz, 3H,  $CH_3$ ).  $^{13}C$  RMN (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  174.0 (CO), 172.8 (CO), 143.1, 137.6, 136.4, 131.1, 130.6, 130.2, 130.0, 129.5, 128.4, 127.6, 126.6, 125.6, 125.1, 125.0, 123.2, 121.0, 116.3, 58.1 ( $CH_2$ ), 55.3 (CH), 49.7 ( $CH_2N$ ), 22.6 ( $CH_2$ ), 19.0 ( $CH_3$ -Ar), 17.8 ( $CH_3$ ), 12.0 ( $CH_3$ ). IR:  $\nu$  3435, 3234, 3021, 2970, 2884, 1694, 1611, 1587, 1561, 1509, 1452, 1351, 750  $cm^{-1}$ . Análisis elemental teórico  $C_{27}H_{31}Cl_2N_3O_3$ : C, 62.79; H, 6.05; N, 8.14; Cl, 13.73. Experimental: C, 62.56; H, 5.87; N, 8.21; Cl, 13.93.



**Sacarinato de prilocaína (65)**

Clorhidrato de prilocaína (0.10 g, 0.40 mmol).

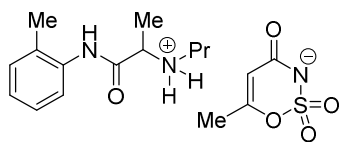
Sacarinato sódico (0.08 g, 0.40 mmol). **65** como un sólido blanco (0.07 g, 48 %).

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.02 (s, 1H, NH), 8.71 (sa, 1H, NH), 7.58 – 7.70 (m, 4H, H-Ar<sub>sacar.</sub>), 7.39 – 7.42 (m, 1H, H-Ar<sub>priloc.</sub>), 7.12 – 7.27 (m, 3H, H-Ar<sub>priloc.</sub>), 4.12 (q, 1H, CH), 2.79 – 2.97 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ar), 1.65 (c,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, NCH<sub>2</sub>), 1.55 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.92 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  168.5 (CO), 168.3 (CN), 145.6 (C-Ar), 135.3, 134.9, 132.6, 132.0, 131.5, 130.9, 126.6, 126.5, 125.6, 122.9, 119.6, 55.9 (CH), 47.4 (CH<sub>2</sub>N), 19.8 (CH<sub>2</sub>), 18.1 (CH<sub>3</sub>-Ar), 16.7 (CH<sub>3</sub>), 11.3 (CH<sub>3</sub>). IR:  $\nu$  3435, 3252, 3067, 2977, 2873, 1694, 1631, 1583, 1545, 1457, 1268, 1148, 945, 757,  $\text{cm}^{-1}$ .

Análisis elemental teórico C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S: C, 59.53; H, 6.25; N, 10.41.

Experimental: C, 59.42; H, 6.49; N, 10.20.

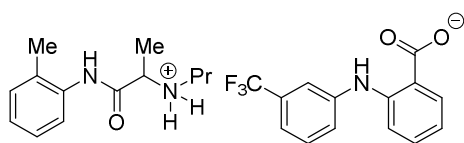
**Prilocaína acesulfamato (66)**

Clorhidrato de prilocaína (0.10 g, 0.39 mmol).

Acesulfamato potásico (0.08 g, 0.39 mmol). **66** como un sólido blanco (0.07 g, 50 %).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9.90 (s, 1H, NH), 8.41 (sa, 1H, NH), 7.42 (d,

$J = 7.7$  Hz, 1H, H-Ar), 7.33 – 7.11 (m, 3H), 5.28 (sa, 1H, CH<sub>vinílico</sub>), 3.96 (c,  $J = 7.1$  Hz, 1H, CH<sub>pril.</sub>), 2.98 – 2.71 (m, 2H, CH<sub>2</sub>N), 2.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ar), 1.90 (s, 3H, CH<sub>3vinílico</sub>), 1.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.51 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.93 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, DMSO)  $\delta$  168.9 (CO), 168.2 (C-O), 160.0 (CO), 135.4, 132.3, 130.9, 126.6, 126.4, 125.3, 102.4 (CH<sub>vinílico</sub>), 56.1 (CH<sub>priloc.</sub>), 47.7 (CH<sub>2</sub>N), 20.1 (CH<sub>3</sub>), 19.7 (CH<sub>2</sub>), 18.0 (CH<sub>3</sub>-Ar), 16.7 (CH<sub>3</sub>), 11.4 (CH<sub>3</sub>). Análisis Elemental teórico C<sub>17</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S: C, 53.25; H, 6.57; N, 10.96. Experimental: C, 53.80; H, 6.33; N, 10.27.

### Prilocaina flufenámico (67)

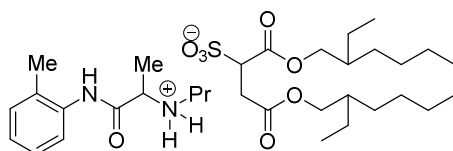


Clorhidrato de prilocaina (0.10 g, 0.40

mmol). Flufenámico sódico (0.12 g, 0.40 mmol). **67** como un sólido blanco (0.14 g, 72 %). <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9.83 (s, 1H), 7.95 (dd,  $J = 7.8, 1.7$  Hz, 1H), 7.60 – 7.53 (m, 1H), 7.53 – 7.43 (m, 3H), 7.38 (m, 1H), 7.33 – 7.14 (m, 4H), 7.09 (td,  $J = 7.4, 1.5$  Hz, 1H), 6.85 (m, 1H), 3.66 (c,  $J = 6.8$  Hz, 1H, CH), 2.69 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.22 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ar), 1.57 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.40 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.91 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C RMN: (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 171.2 (CO), 170.5 (CO), 145.2, 143.1, 136.0, 132.9, 132.4, 131.9, 130.9, 130.8, 130.7, 130.3, 126.5, 125.5, 124.1, 122.9 (c,  $J = 268$  Hz, CF<sub>3</sub>), 121.0, 119.0, 117.8, 115.5, 114.9, 68.8, 48.8, 29.9, 21.6, 18.1 (CH<sub>3</sub>-Ar), 17.9 (CH<sub>3</sub>), 11.8 (CH<sub>3</sub>). IR:  $\nu$  3435, 3059,

2969, 1667, 1585, 1511, 1374, 1335, 1289, 1122, 756  $\text{cm}^{-1}$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$ : C, 64.66; H, 6.03; N, 8.38. Experimental: C, 64.33; H, 6.20; N, 8.22.

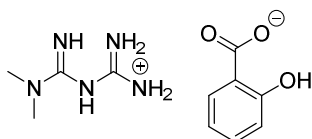
### Prilocaina docusato (68)



Clorhidrato de prilocaína (0.10 g, 0.40 mmol).

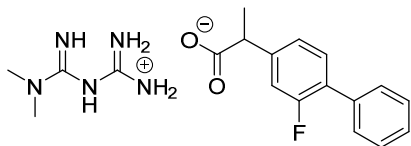
Docusato sódico (0.17 g, 0.40 mmol). **68** como un líquido (0.18 g, 72 %).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9.95 (s, 1H, NH), 8.82 (sa, 1H, NH), 7.37 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, H-Ar), 7.31 – 7.13 (m, 4H, H-Ar), 4.07 (q,  $J = 6.7$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{prilocaína}}$ ), 3.97 – 3.80 (m, 4H), 3.63 (dd,  $J = 11.3, 3.8$  Hz, 1H, CH), 2.99 – 2.73 (m, 4H), 2.22 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-Ar}$ ), 1.64 (dd,  $J = 15.2, 7.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{2\text{prilocaína}}$ ), 1.56 – 1.46 (m, 6H), 1.26 – 1.22 (m, 16H,  $8\text{CH}_2$ ), 1.00 – 0.73 (m, 15H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz, DMSO)  $\delta$  171.4 ( $\text{CO}_{\text{doc.}}$ ), 168.7 ( $\text{CO}_{\text{doc.}}$ ), 168.1 ( $\text{CO}_{\text{pril.}}$ ), 135.2, 134.1, 132.6, 130.9, 126.6, 125.7, 66.5 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 66.4 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 61.8 ( $\text{CHSO}_3$ ), 55.8 ( $\text{CH}_{\text{pril.}}$ ), 47.3 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 38.6 (CH), 38.5 (CH), 34.5 ( $\text{CH}_2$ ), 30.1, 29.9, 28.7, 23.5, 23.3, 22.8, 19.6, 18.1, 16.6, 14.3, 11.3, 11.1. Análisis Elemental teórico  $\text{C}_{33}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$ : C, 61.65; H, 9.09; N, 4.36; S, 4.99. Experimental: C, 61.38; H, 9.04; N, 4.51; S, 4.96.

Procedimiento general para la síntesis de ILs de metformina como se muestra con el caso del **salicilato de metformina (69)**.



Clorhidrato de metformina (0.50 g, 3.03 mmol) y salicilato sódico (0.49 g, 3.03 mmol) se disuelven en MeOH (20 mL), la mezcla de reacción se mantiene durante 12 h a t.a. A continuación, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se disuelve en 2-propanol (20 mL). El sólido (NaCl) es filtrado y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose salicilato de metformina como un sólido blanco. (0.73 g, 90 %). P.f 148 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 7.66 (dd,  $J = 7.5, 1.9$  Hz, 1H, CH-Ar), 7.14 [m, 3H, (2 NH + 1 CH-Ar)], 6.87 [m, 4H, (4NH)], 6.61 [m, 3H, (2 CH-Ar+ 1 OH)], 2.93 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 172.2 (CO), 163.1 (C-OH), 159.5 (C=NH), 160.0 (C=NH), 131.8 (CH-Ar), 130.3 (CH-Ar), 120.7 (Car), 116.4 (CH-Ar), 37.8 ppm (2CH<sub>3</sub>). Análisis elemental teórico C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>: C, 49.43; H, 6.41; N, 26.20. Experimental: C, 49.37; H, 6.68; N, 25.99.

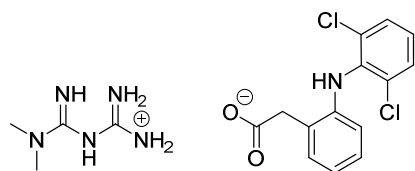
### Metformina-flurbiprofen (70)



Clorhidrato de metformina (0.14 g, 0.82 mmol). y Flurbiprofen sódico (0.22 g, 0.82 mmol). **70** como un sólido blanco. (0.21 g, 90

%). P.f. 138 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7.54 – 7.41 (m, 5H), 7.41 – 7.28 (m, 3H), 7.18 (m, 1H), 7.14 (s, 1H, NH), 7.01 (s, 2H, NH), 3.34 (c,  $J = 7.1$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 2.90 (s, 6H, 2 $\text{CH}_3$ ), 1.28 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm) 176.8 (CO), 160.7 (C=NH), 160.0 (C=NH), 159.0 (d,  $J = 244.2$  Hz, CF), 148.4, 136.0, 130.0, 129.01, 128.99, 127.8, 125.3, 125.2, 124.4, 115.1 (d,  $J = 22.4$  Hz), 48.7 (CH), 37.7 (2 $\text{CH}_3$ ), 20.2 ( $\text{CH}_3$ ). IR:  $\nu$  3455.6, 3309.1, 3076.9, 1650.4, 1564.8, 1487.5, 1417.9, 1393.2, 1050.2, 928.0, 695.8  $\text{cm}^{-1}$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{FN}_5\text{O}_2$ : C, 61.11; H, 6.48; N, 18.75; experimental C, 61.00; H, 6.30; N, 18.20.

### Metformina-diclofenaco (71)



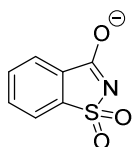
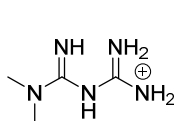
Clorhidrato de metformina (0.5 g, 3.03 mmol).

Diclofenaco sódico (1.0 g, 3.03 mmol). **71** como un sólido blanco (1.0 g, 80 %).

P.f. 218 °C.  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  10.17 (s, 1H,  $\text{NH}_{\text{diclof}}$ ), 7.43 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, H-Ar), 7.30 – 7.09 (m, 4H, NH), 7.04 (m, 2H, H-Ar), 6.91 (m, 1H, H-Ar), 6.72 (m, 1H, H-Ar), 6.22 (m, 1H, H-Ar), 3.35 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 2.90 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}$ )  $\delta$  175.8 (CO), 159.5 (C=NH), 159.4 (C=NH), 143.6, 138.5, 130.4, 129.4, 129.2, 128.7, 126.0, 124.2, 120.2, 115.8, 45.0 ( $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 37.7 (2 $\text{CH}_3$ ). IR:  $\nu$  3442.3, 3310.6, 3192.3, 1648.6, 1577.2, 1492.5,

1453.1, 1050.0  $\text{cm}^{-1}$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_2$ : C, 50.83; H, 5.21; N, 19.76; experimental C, 50.71; H, 5.30; N, 19.02.

### Sacarinato de metformina (72)

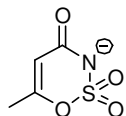
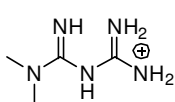


Clorhidrato de metformina (0.20 g, 1.20 mmol).

Sacarinato sódico (0.25 g, 1.20 mmol). **72** como un sólido blanco (0.23 g, 60 %).

P.f. 194  $^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7.68 – 7.46 (m, 4H, H-Ar), 7.20 (sa, 2H, NH), 6.76 (sa, 4H, NH), 2.91 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  168.0 (C-O), 159.2 (C=NH), 158.4 (C=NH), 145.2 (CS), 134.7, 131.6, 131.1, 122.5, 119.1, 37.4 ( $2\text{CH}_3$ ). IR:  $\nu$  3369, 1639, 1585, 1565, 1496, 1258, 1143, 948, 608  $\text{cm}^{-1}$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_3\text{S}$ : C, 42.30; H, 5.16; N, 26.91; experimental C, 42.01; H, 5.44; N, 26.87.

### Acesulfamato de metformina (73)

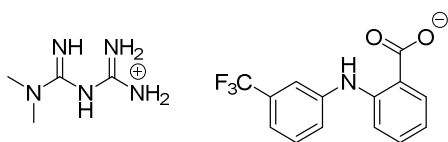


Clorhidrato de metformina (0.20 g, 1.20 mmol).

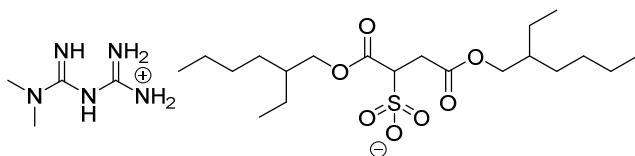
Acesulfamato potásico (0.24 g, 1.20 mmol). **73** como un sólido blanco (0.21 g, 60 %). P.f 185.1  $^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7.20 (sa, 2H, NH), 6.64 (sa, 4H, NH), 5.33 – 5.19 (m, 1H,  $\text{CH}_{\text{vinílico}}$ ), 2.93 (s, 6H,  $2\text{CH}_3$ ), 1.90 (d,  $J = 1.1$  Hz, 3H,

$\text{CH}_{3\text{vinílico}}$ ).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  168.1 (CO), 159.6 (C=NH), 158.7 (C=NH), 160.0, 102.5 ( $\text{CH}_{\text{vinílico}}$ ), 37.8 ( $2\text{CH}_3$ ), 19.8 ( $\text{CH}_{3\text{vinílico}}$ ). IR 3369, 3175, 1622, 1586, 1296, 1179, 936,  $655\text{ cm}^{-1}$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}$ : C, 32.87; H, 5.52; N, 28.75; experimental C, 32.71; H, 5.34; N, 29.02.

### Metformina-flufenámico (74)



Clorhidrato de metformina (0.24 g, 1.42 mmol). Flufenámico sódico (0.43 g, 1.42 mmol). **74** como un sólido blanco (0.47 g, 80 %). P.f.  $140\text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7.98 – 7.83 (m, 1H), 7.51 – 7.33 (m, 4H), 7.30 – 7.21 (m, 2H), 7.20 – 7.10 (m, 3H), 7.03 (sa, 4H, NH), 6.77 (m, 1H), 2.91 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  170.3 (CO), 158.9 (C=NH), 158.8 (C=NH), 144.1 (CNH), 143.4 (CNH), 131.9, 130.8, 130.4, 129.9 (c,  $J=31.3$ ,  $\text{C}\alpha$ ), 124.2 (c,  $J=272.3$ ,  $\text{CF}_3$ ), 121.5, 118.3, 116.4 (c,  $J=3.3$ ,  $\text{C}\beta$ ), 114.2 (c,  $J=3.3$ ,  $\text{C}\beta$ ), 113.8, 37.3 ( $2\text{CH}_3$ ). IR:  $\nu$  3371, 3324, 3190, 1584, 1508, 1331, 1163, 1113,  $703\text{ cm}^{-1}$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_2$ : C, 52.68; H, 5.16; N, 20.48. Experimental C, 52.14; H, 5.57; N, 20.86.

**Docusato de metformina (75)**

Clorhidrato de metformina

(0.20 g, 1.21 mmol). Docusato sódico (0.53 g, 1.21 mmol). **75** como un líquido. (0.54 g, 81 %).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7.20 (sa, 2H, NH), 6.56 (sa, 4H, NH), 3.89 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.63 (dd,  $J = 11.4, 3.8$  Hz, 1H,  $\text{COCHS}$ ), 2.94 (s, 6H), 2.88 – 2.72 (m, 2H), 1.50 (m, 2H), 1.39 – 1.16 (m, 16H), 0.94 – 0.76 (m, 12H).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  171.4 (CO), 168.7 (CO), 159.6 (C=NH), 158.5 (C=NH), 66.5 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 62.3, 61.6 ( $\text{CHSO}_3$ ), 38.5 (2CH), 37.8 (2 $\text{CH}_3$ ), 34.5, 30.1, 29.9, 28.7, 25.8, 23.5, 23.4, 22.8, 14.3 (2 $\text{CH}_3$ ), 11.2 (2 $\text{CH}_3$ ). IR 3350.5, 2931.8, 2960.9, 1737.3, 1642.8, 1567.4, 1236.4, 1040.8  $\text{cm}^{-1}$ . Análisis elemental teórico  $\text{C}_{24}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$ : C, 52.25; H, 8.95; N, 12.69; experimental C, 52.00; H, 9.02; N, 12.73.

**PARTE EXPERIMENTAL**

**DSC.** Los experimentos se llevaron a cabo en un calorímetro diferencial de barrido (TETTLER TA 4000/DSC30) calibrado con indio ( $T_m = 156.6$  °C,  $\Delta H_m = 28.45$  kJ/kg) y zinc ( $T_m = 419.47$  °C,  $\Delta H_m = 108.37$  kJ/kg).

Los experimentos se llevaron a cabo bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  y a un flujo de 25 mL/min, y la muestra, 10 mg aproximadamente, se ponía en una capsula de aluminio cerrada.



Las muestras se calentaron de 5 a 180 °C a una velocidad de 5 °C/min y a continuación, se enfriaron hasta 0 °C a 2, 5 y 10 °C/min. En el segundo calentamiento las muestras se calentaron a 180 °C a 2, 5 y 10 °C. Las temperaturas de fusión y cristalización,  $T_m$  y  $T_c$ , corresponden al máximo de las transiciones endotérmicas y exotérmicas, respectivamente. Los ciclos de calentamiento y enfriamiento se repitieron 4 veces para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

**WAXS.** Las medidas se llevaron a cabo en la instalación sincrotrón HASYLAB (DESY, Hamburgo). Los experimentos se realizaron con radiografías monocromáticas de 0,15 nm de longitud de onda con un solo cristal de germanio como el elemento de dispersión. La dispersión se detectó con un detector lineal Gabriel, y el ángulo de dispersión del patrón de WAXS fue calibrado con un estándar de PET. La metodología utilizada en el de cristalización y de fusión experimentos de las muestras fue similar a la descrita para los experimentos calorimétricos. Las mediciones fueron realizadas con tiempos de adquisición de entre 30 y 150 s, dependiendo de la velocidad de calentamiento.

## PARTE EXPERIMENTAL FARMACOLÓGICA

### Diseño experimento y preparación de animales

Se han empleado ratas (*Rattus Norvegicus*) macho de la cepa Zucker obesa (fa/fa) carentes del receptor para la leptina procedentes de Charles Rivers Laboratories España, S.A. (Barcelona, Spain), cuyos pesos oscilaron entre 575-

600 g al inicio de los experimentos. Los animales fueron enjaulados individualmente, en condiciones de temperatura (22 °C) y humedad (55 %) controladas bajo un ciclo luz/oscuridad de 12 horas (luz apagada de 20:00-8:00 h).

Todos los fármacos fueron preparados en fresco en una solución compuesta por Tween-80 al 5 % en suero fisiológico estéril. Las diferentes dosis fueron preparadas en viales distintos de modo que tras pesar la cantidad de compuesto necesaria, se añadía Tween-80. El compuesto, con su correspondiente volumen de tensoactivo, era sonicado y homogeneizado (con ayuda de un imán de agitación) durante 15-30 min. A continuación se añadía lentamente el volumen necesario de suero hasta completar la solución.

Antes de iniciar los experimentos, los animales fueron habituados a su manipulación. Después de esta fase inicial de habituación, los animales fueron privados de comida durante 12 h siempre con acceso libre al agua. Transcurrido ese tiempo de ayuno, se establecieron los diferentes grupos de tratamiento compuesto de  $n=8$  cada uno.

Los compuestos y el vehículo fueron administrados a una dosis de  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  vía intraperitoneal (i.p.) de forma aguda en un volumen de administración de 1 mL por kg de animal 120 min antes de la prueba de tolerancia a la glucosa.

#### *Prueba de tolerancia a la glucosa*

Se llevó a cabo mediante inyección de vía i.p. de una sobrecarga de glucosa de  $2 \text{ g kg}^{-1}$  de peso corporal del animal. Las muestras de sangre se recogieron mediante corte en la punta de la cola a tiempo 0, 5, 10, 15, 30, 60 y 120 min

después de la administración de glucosa. La glucosa se determinó usando un método de glucosa oxidasa estándar (glucómetros comerciales).

#### *Análisis estadístico*

Los datos se recogieron y presentaron en tablas con valor medio de concentración de glucosa para cada tiempo (mg/dL) y el Error Estándar de la Media (SEM). Para el contraste de hipótesis se realizó una ANOVA de 2 vías para la detección de diferencias en el tiempo y tratamiento. seguida de un análisis post hoc para comparaciones múltiples (Prueba de Bonferroni). Una probabilidad  $p < 0,05$  fue considerada como significativa (\*) y una probabilidad  $p < 0,01$  como muy significativa (\*\*).



# Capítulo 3

A pesar de los avances en las nuevas tecnologías para el diseño de fármacos que incluyen la genómica y proteómica, el high-throughput-screening (HTS), el diseño basado en la estructura, por fragmentos, etc..., continúa siendo muy difícil y costoso introducir nuevos fármacos en el mercado, por lo que hay quien piensa que para descubrir un nuevo medicamento lo mejor es empezar por uno viejo. En este contexto, conceptos como el diseño de análogos, químicos o farmacológicos, variaciones estructurales, “me-toos” (definidos como compuestos que tienen estructura química similar o el mismo mecanismo de acción que fármacos ya comercializados), continúan siendo métodos válidos para preparar nuevos medicamentos.

La ventaja de utilizar un fármaco establecido para diseñar uno nuevo es, entre otras, que la diana terapéutica sobre la que actúa ya está validada. El diseño de fármacos basado en análogos (ABDD, analogue based drug discovery) está bien documentado y recientemente, la IUPAC ha dedicado tres monografías al tema. En una de ellas, los autores han analizado los cien medicamentos más utilizados llegando a la conclusión que entre estos solo hay nueve que pueden considerarse “stand alones” o “first-in-class” ya que no existen análogos eficaces de los mismos. Uno de estos es el paracetamol, del que no hay ningún análogo propiamente dicho comercializado, aunque sí hay algunos en fase experimental. El paracetamol es un analgésico carente de efectos gástricos, que viene utilizándose desde hace décadas, pero cuyo mecanismo de acción no ha sido totalmente establecido y continúa siendo objeto de estudio.

Así pues, en el tercer y último capítulo de esta tesis se utiliza el diseño de análogos como aproximación para preparar nuevos fármacos. Se ha escogido el paracetamol por lo expuesto anteriormente, y se han preparado análogos del mismo sustituyendo el fenilo de su estructura por un adamantilo. Se ha evaluado la actividad analgésica de los nuevos análogos y se ha iniciado el estudio de su posible mecanismo de acción.



### 3.1. INTRODUCCIÓN

#### 3.1.1 EL DOLOR: DEFINICIÓN Y TRATAMIENTO

La percepción de dolor es una experiencia común a la mayoría de los seres humanos siendo el principal motivo de consulta médica aunque en algunos casos, no es posible establecer una relación causa-efecto entre las lesiones o alteraciones que pueden identificarse y el dolor que un paciente refiere. (P.Goya, M.I. Martín. “¿Qué sabemos del dolor?”. Ed. Catarata. 2010).

La definición oficial de dolor según la Asociación Mundial para el Estudio del Dolor (IASP) es relativamente compleja: «Es una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con un daño tisular, real o potencial, o descrita en términos de dicho daño» y, si la suponemos dirigida a alguien sin experiencia del dolor, está claro que no es fácil que esta definición sea útil para entender que siente la persona que padece dolor. Teniendo en cuenta esto y considerando el derecho al tratamiento cuando aparece dolor, con independencia de la posibilidad de establecer claramente su causa, se ha aceptado una nueva, curiosa y pragmática definición de dolor: dolor es todo aquello que un paciente dice que le duele.

La clasificación de los tipos de dolor puede ser bastante compleja y realizarse en función de distintas características como su causa o etiología, su localización su duración etc. La clasificación más habitualmente utilizada agrupa los tipos de dolor en tres categorías:

Dolor nociceptivo o somático: es el originado fundamentalmente por estímulos externos agudos claramente conocidos: como una herida o un golpe, o por lesiones agudas en tejidos u órganos internos; es de duración limitada al tiempo que dure la estimulación y debe ceder cuando se retira el estímulo nocivo.

Dolor inflamatorio: este tipo de dolor está relacionado con lesiones tisulares, puede ser secundario a una lesión que puede ser causada por un estímulo nocivo y cuando el estímulo nocivo es de suficiente duración o intensidad para dañar los tejidos, el dolor no cesará al retirar el estímulo. También puede desarrollarse por diferentes procesos patológicos como infecciones u otros procesos que provoquen inflamación (alteraciones autoinmunes, neoplasias...), y, a veces, su causa desencadenante no se puede determinar con precisión (reumatismos p.ej.) pero, en cualquier caso, siempre son debidos a que continúa existiendo un proceso concreto que, cuando se corrige motiva la reducción o la desaparición del dolor.

Dolor neuropático: es el tipo de dolor más complejo, peor conocido y, con diferencia, el más difícil de tratar. Su origen está en alteraciones que se encuentran dentro de las vías de transmisión del dolor o en los propios centros de percepción del dolor, con mucha frecuencia no se conoce su desencadenante e incluso puede ser difícil o imposible, con los medios disponibles, determinar el punto exacto donde se encuentra la alteración que lo genera.

En la práctica los tres tipos de dolor pueden ser componentes del dolor que un paciente percibe, que se presentan de forma simultánea, y no siempre es fácil separarlos. Una lesión por un estímulo externo puede desencadenar un proceso



inflamatorio cuyos efectos se superponen al dolor ocasionado por el estímulo nocivo; si esto se prolonga, se pueden alterar funciones neuronales en el sistema nervioso central y añadir a lo anterior componentes neuropáticos. Si se llega a este punto, el dolor es mucho más difícil de tratar y puede continuar incluso cuando la lesión que lo inició haya cesado.

El tratamiento farmacológico del dolor es la opción más habitual y en la mayoría de los casos puede eliminar, o, al menos, reducir lo suficiente el dolor para permitir que la calidad de vida del paciente sea satisfactoria. Los medicamentos comercializados para el tratamiento farmacológico (analgésicos) se pueden dividir en dos grandes grupos: AINE y opioides. El término AINE se refiere a antiinflamatorios no esteroideos, y el término opioide a fármacos derivados o relacionados con las sustancias presentes en el opio. Sus mecanismos de acción son diferentes: los AINE actúan inhibiendo la síntesis de las prostaglandinas, compuestos endógenos mediadores del dolor, mientras que los opioides actúan interaccionando con los receptores opioides. Ambas series, AINE y opioides, derivan de compuestos naturales que se aislaron en el siglo XIX y están relacionados los primeros con la aspirina y los segundos con la morfina.

En todos los casos la primera intención es tratar la causa del dolor, es decir corregir la disfunción (inflamación, infección lesión tisular), pero esto no siempre es posible, y cuando el dolor se ha cronificado resolver la causa inicial ya no es suficiente para corregirlo, este pasa de ser un síntoma acompañante a convertirse en una enfermedad en si misma que precisa tratamiento.

La Figura 57 muestra la escalera propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>107</sup> para tratar dolores de intensidad creciente. Cada escalón propone el uso de analgésicos más potentes y la idea inicial es ir agotando las posibilidades de una opción antes de pasar a la siguiente etapa de tratamiento (Figura 57).

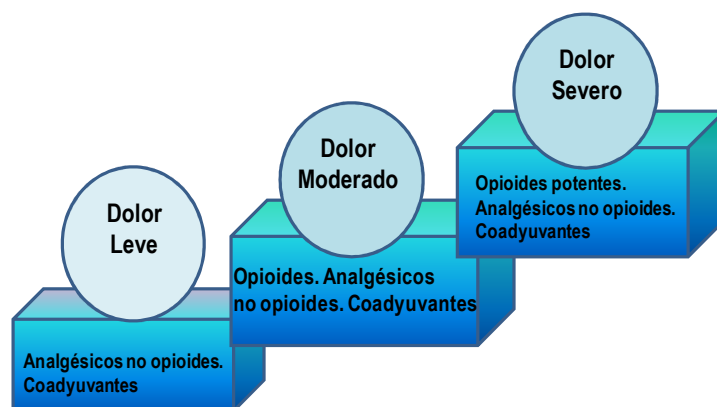


Figura 57. Escalera analgésica de la OMS.

Así, para dolores de intensidad leve a moderada se propone el uso de analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), es decir fármacos del tipo de la aspirina, acompañados, si es necesario, de adyuvantes esto es fármacos con moderada eficacia analgésica que potencian el efecto de otros analgésicos (antidepresivos, antiepilépticos, antipsicóticos).

Si el dolor persiste se pasaría al segundo escalón añadiendo un opioide débil, del tipo de la codeína, que puede combinarse con las medicaciones anteriores o

<sup>107</sup> Organization, W. H. Accessed on April 2006, 15, 2006.

sustituirlas, es decir se podría continuar con los AINE o reemplazarlos por el nuevo medicamento.

Si el dolor aun persiste, se alcanzaría el tercer escalón donde estaría indicado utilizar cualquier tipo de opioide acompañado de AINE y de analgésicos coadyuvantes.

En la actualidad, la validez de esta pauta de progresión está cuestionada y algunos autores hablan del ascensor analgésico, es decir de un ascenso más rápido, la idea es no ascender progresivamente sino comenzar el tratamiento directamente en el escalón que parezca más adecuado para resolver el dolor, basando la selección en la intensidad del mismo.

### **3.1.2. ANALGÉSICOS: PARACETAMOL**

La búsqueda de nuevos fármacos con actividad analgésica es constante. Los fármacos que existen actualmente en el mercado no son suficientemente eficaces frente a algunos tipos de dolor y los efectos adversos que presentan no permiten el uso continuado de los mismos.<sup>108</sup>

Uno de los analgésicos y antipiréticos más utilizados es el acetaminofen o paracetamol. Ocupa un lugar singular en el campo de los medicamentos para el tratamiento del dolor ya que, prácticamente, no es antiinflamatorio ni tiene efectos gástricos, y, en contraste con los opioides, no produce depresión respiratoria. Según la FDA en la actualidad existen 235 fármacos que contienen el paracetamol como principio activo. Recientemente diferentes líneas de

---

<sup>108</sup> Kissin, I. *Anesthesia & Analgesia* **2010**, 110, 780.

investigación han demostrado su efecto beneficioso en el control de la glucosa en sangre, y su uso potencial como agente neuroprotector.<sup>109</sup>

En la antigüedad, la corteza del sauce y de la quina eran las únicas fuentes naturales de agentes antipiréticos conocidas hasta el momento. Durante la búsqueda de nuevas alternativas sintéticas se descubrió la acetanilida en 1886, la cual poseía ventajas sobre el producto natural de la quina, presentando propiedades analgésicas y antipiréticas. Tras encontrar evidencias sobre la toxicidad de este derivado de anilina se buscaron nuevos análogos, obteniéndose finalmente la fenacetina. En 1878, Morse sintetizó el paracetamol pero no fue hasta 1887 cuando comenzó a utilizarse en clínica. En 1948, Bernard Brodie y Julius Axelrod demostraron que el efecto analgésico de la acetanilida y la fenacetina se debía a su metabolito activo: el paracetamol, también se observó que la toxicidad producida por ambos análogos sintéticos se debía a otro metabolito, la fenilhidroxilamina ( Figura 58).

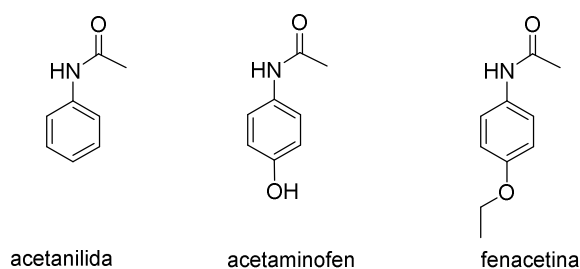


Figura 58. Derivados de anilina.

<sup>109</sup> Blough, E. R.; Wu, M. *Frontiers in Pharmacology* **2011**, 2.

En 1950, el paracetamol se comercializó y rápidamente su popularidad se extendió por diferentes países, en EEUU bajo el nombre de Tylenol, y en el Reino Unido como Panadol. En la actualidad, el paracetamol es comercializado en diferentes formas farmacéuticas, y existen formulaciones en las que se combina con otros principios activos como la codeína, un compuesto de naturaleza opioide; esta formulación se comercializa en España con el nombre de Algidol (Almirall).

Si bien el acetaminofen se utilizaba como analgésico y antipirético desde hace más de un siglo, los avances acerca de su mecanismo de acción no se han dado a conocer hasta hace relativamente pocos años. En un principio se pensaba que su mecanismo de acción era similar al de los AINE y los salicilatos, pero la falta de efecto antiinflamatorio por parte del acetaminofen le diferenciaba de este tipo de fármacos analgésicos, y además, no producía daño gastrointestinal. En contraste con los derivados opiáceos, su efecto analgésico frente al dolor intenso no era efectivo y esto permitía diferenciar ambos mecanismos de acción. Se podría pensar entonces que el peculiar efecto analgésico y sus efectos secundarios podrían sugerir un nuevo mecanismo de acción para el acetaminofen, a pesar de que en la bibliografía se encuentran muchas referencias para demostrar la similitud con los AINE y los salicilatos. Tras descubrir que el efecto terapéutico de los AINE se debía a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX), una vez más se *insistió* en demostrar que el efecto analgésico del acetaminofen

se debía a la inhibición de esta enzima.<sup>110</sup> La inhibición de la COX por parte del acetaminofen era dependiente de la concentración de peróxidos, esto justificaría la falta de efecto del acetaminofen en zonas de inflamación donde la concentración de esta especie es elevada. Se ha observado que los efectos inhibitorios del acetaminofen a concentraciones terapéuticas se producen cuando los niveles de ácido araquidónico son bajos, y este efecto ocurre cuando la síntesis de prostaglandinas está sujeta a la acción de la isoforma COX-2; de ahí que se sugiriera que el acetaminofen era un inhibidor selectivo de esta isoforma. Otras hipótesis sugerían la posible existencia de una tercera isoforma de la enzima COX, pero los estudios clínicos no le han dado demasiada relevancia a este estudio.<sup>111,112</sup>

Desde hace unos años, los datos en la bibliografía sobre el mecanismo de acción del acetaminofen han dado un giro interesante respecto a lo que se venía publicando hasta entonces. La posibilidad de que se haya estado utilizado un compuesto de naturaleza cannabinoide como analgésico y antipirético desde hace más de un siglo, sin ser conscientes de ello, es una idea al menos sorprendente. Zygmunt *et al.* han demostrado experimentalmente que en una parte del efecto analgésico del acetaminofen intervenía de forma indirecta el receptor cannabinoide CB1. Los componentes del sistema endocannabinoide como el receptor CB1, receptor CB2 y la enzima amidohidrolasa de ácidos

---

<sup>110</sup> Vane, J. R. *Nature: New Biology* **1971**, 231, 232.

<sup>111</sup> Boutaud, O.; Aronoff, D. M.; Richardson, J. H.; Marnett, L. J.; Oates, J. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, 99, 7130.

<sup>112</sup> Graham, G. G.; Scott, K. F. *American Journal of Therapeutics* **2005**, 12, 46.

grasos (FAAH) son interesantes dianas terapéuticas involucradas en fenómenos como el dolor, lo que se ha demostrado en repetidas ocasiones. El acetaminofen sufre una primera etapa de desacetilación obteniéndose el 4-aminofenol, éste se conjuga con el ácido araquidónico en una segunda etapa, dando lugar al AM404 en cerebro y médula espinal (Figura 59).

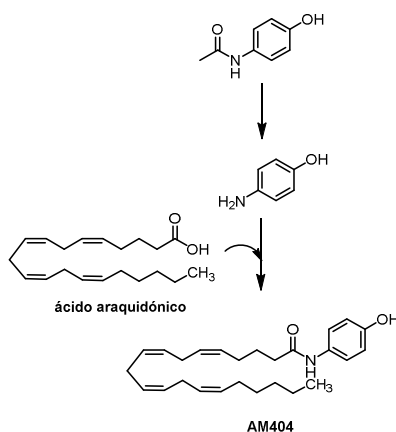


Figura 59. Metabolismo del acetaminofen.

La enzima involucrada en el proceso es la enzima FAAH la cual interviene en el proceso de hidrólisis de la anandamida, y en la catálisis de su síntesis a partir del ácido araquidónico y la etanolamina. La presencia necesaria de esta enzima en la biotransformación del acetaminofen para obtener el AM404 ha sido demostrada con ensayos *in vivo* en ratones knockout, donde se observó que en ausencia de la enzima FAAH se bloqueaba la formación del metabolito.<sup>113</sup> El AM404 pertenece al grupo N-acilaminas bioactivas, junto a lípidos endógenos

<sup>113</sup> Högestätt, E. D.; Jönsson, B. A.; Ermund, A.; Andersson, D. A.; Björk, H.; Alexander, J. P.; Cravatt, B. F.; Basbaum, A. I.; Zygmunt, P. M. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 31405.

como la anandamida (araquidonoil-etanolamida) y otros compuestos sintéticos como el olvanil. Estos compuestos tienen la capacidad, al igual que los cannabinoides, de poseer actividad analgésica.<sup>114</sup> El AM404 es un potente activador del receptor vanilloide subtipo 1 (TRPV1) y un inhibidor del transportador de membrana de anandamida.<sup>115</sup> La afinidad del AM404 por el receptor CB1 no es muy alta pero a través de ensayos *in vivo* se demuestra que este receptor está involucrado, al menos en parte de la actividad analgésica del acetaminofen de forma indirecta, ya que la presencia de ligandos antagonistas CB1 como: HU210 y SR141716A bloquean la actividad analgésica del fármaco.<sup>116</sup>

Esta teoría sobre el mecanismo del paracetamol hace que siga siendo objeto de estudio en la actualidad. De hecho en 2011 D. A Andersson *et al.* revelaron el papel del TRPA1 en el mecanismo de analgesia del paracetamol. En sus estudios se apunta la importancia de los metabolitos electrófilos *N*-acetil-*p*-benzoquinonaimina y *p*-benzoquinona, y por otro lado, la posibilidad de considerar al canal TRPA1 (anquinina receptor de potencial transitorio) como una diana potencial para aliviar el dolor.

Los canales iónicos pertenecientes a la superfamilia de receptores de potencial transitorio (TRP) han suscitado un gran interés en la actualidad. Concretamente, los denominados termo-TRP que son regulados por la temperatura y diferentes

---

<sup>114</sup> Gühring, H.; Hamza, M.; Sergejeva, M.; Ates, M.; Kotalla, C. E.; Ledent, C.; Brune, K. *European Journal of Pharmacology* **2002**, 454, 153.

<sup>115</sup> Giuffrida, A.; Rodriguez de Fonseca, F.; Nava, F.; Loubet-Lescoulié, P.; Piomelli, D. *European Journal of Pharmacology* **2000**, 408, 161.

<sup>116</sup> Ottani, A.; Leone, S.; Sandrini, M.; Ferrari, A.; Bertolini, A. *European Journal of Pharmacology* **2006**, 531, 280.



estímulos físico-químicos, son considerados potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento del dolor.<sup>117</sup> Los receptores de potencial transitorio anquirina 1 (TRPA1) fueron identificados en 1999 por Jaquemar y colaboradores,<sup>118</sup> y es el único miembro de la subfamilia de anquirina TRP identificado en humanos. Su estructura consiste en 6 dominios transmembrana y un dominio en forma de poro iónico entre los segmentos 5º y 6º. En el extremo *N*-terminal se localizan varios residuos de cisteína y 14 repeticiones de anquirina en las cuales se identifica el centro de activación.

Los TRPA1 se localizan principalmente en una subpoblación de neuronas sensoriales. Su mecanismo de activación consiste en la modificación covalente de alguno de los residuos de cisteína por parte de una sustancia reactiva. Son activados por compuestos reactivos endógenos y exógenos como por ejemplo la formalina, la acroleína, el aceite de mostaza y especies reactivas de oxígeno.<sup>119</sup>

### 3.1.3. DERIVADOS DE ADAMANTANO EN QUÍMICA MÉDICA

Desde hace décadas se han diseñado derivados de adamantano con actividad farmacológica probada.<sup>120</sup> La diversidad de dianas biológicas en las que estos derivados actúan la convierten en una estructura privilegiada en el campo de la Química Médica.

---

<sup>117</sup> Broad, L. M.; Mogg, A. J.; Beattie, R. E.; Ogden, A.-M.; Blanco, M.-J.; Bleakman, D. **2009**.

<sup>118</sup> Jaquemar, D.; Schenker, T.; Trueb, B. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, 7325.

<sup>119</sup> del Camino, D.; Murphy, S.; Heiry, M.; Barrett, L. B.; Earley, T. J.; Cook, C. A.; Petrus, M. J.; Zhao, M.; D'Amours, M.; Deering, N. *The Journal of Neuroscience* **2010**, 30, 15165.

<sup>120</sup> Spasov, A.; Khamidova, T.; Bugaeva, L.; Morozov, I. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **2000**, 34, 1.

La síntesis de Schleyer dio lugar al avance en el estudio del adamantano (triciclo[3.3.1.1]decano) y su funcionalización. Desde entonces los derivados de adamantano comenzaron a ser estudiados farmacológicamente y continúan siéndolo en la actualidad. Este esqueleto hidrocarbonado aumenta la lipofilia y la estabilidad mejorando por tanto las propiedades farmacocinéticas del candidato a fármaco.<sup>121</sup>

En 1964 se identificó la 1-adamantina (amantadina) como un antiviral muy potente frente al virus *Influenza A*<sup>122</sup> y rápidamente se introdujo en el mercado. Otros aminoadamantanos han presentado una actividad antiviral como los 3-ciclopentil-1-adamantanoaminas, la rimantadina y tromantadina. Concretamente, la amantadina y la memantina (3,5-dimetilaminoadamantano) poseen una fuerte actividad frente al virus de la gripe A (Figura 60).

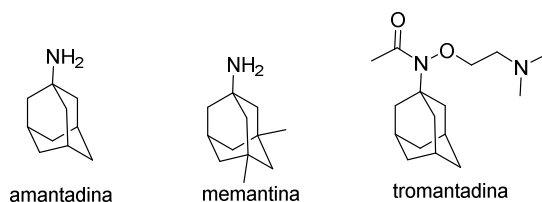


Figura 60. Derivados de adamantano con actividad antiviral.

La actividad psicotrópica que poseen algunos derivados de adamantano viene determinada por el grupo amino, su basicidad y la posición del átomo de

<sup>121</sup> Wanka, L.; Iqbal, K.; Schreiner, P. R. *Chemical Reviews* **2013**, 113, 3516.

<sup>122</sup> Davies, W.; Grunert, R.; Haff, R.; McGahen, J.; Neumayer, E.; Paulshock, M.; Watts, J.; Wood, T.; Hermann, E.; Hoffmann, C. *Science* **1964**, 144, 862.

nitrógeno en el heterociclo. Se ha demostrado que derivados como piperazinas N-(1-adamantil)-N'-sustituidas estimulan el sistema nervioso central.<sup>123</sup>

Otras actividades farmacológicas en las que se encuentran involucrados este tipo de derivados son la dopaminérgica y la analgésica.<sup>124</sup> Existen derivados que actúan como ligandos antagonistas selectivos del receptor D<sub>1</sub>, que presentan actividad en modelos de animales para el tratamiento del Parkinson, y remiten los efectos producidos por esta neuropatía aumentando la actividad locomotora. Los estudios sobre la influencia de algunos derivados de adamantano con actividad hormonal no están muy desarrollados, aunque se ha demostrado que los derivados 1 o 2-adamantanoaminas producen un aumento dosis-dependiente en la secreción de insulina en ensayos *in vitro*.<sup>125</sup> El 1-aminoadamantano (amantadina) y su análogo 3,5-dimetilaminoadamantano (memantina), son antagonistas del receptor ionotrópico N-metil D-aspartato (NMDA) mostrando actividad en modelos animales de Parkinson y Alzheimer; la memantina ha sido aprobada como fármaco para el tratamiento del Alzheimer en pacientes.<sup>126</sup>

Más recientemente, han sido diseñados dos derivados de adamantano: Vildagliptin y saxagliptin, ambos son inhibidores de la enzima Dipeptidil

---

<sup>123</sup> Litvinov, V. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **2002**, 38, 9.

<sup>124</sup> Battilocchio, C.; Guetzoyan, L.; Cervetto, C.; Di Cesare Mannelli, L.; Frattaroli, D.; Baxendale, I. R.; Maura, G.; Rossi, A.; Sautebin, L.; Biava, M. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2013**.

<sup>125</sup> Garrino, M.; Plant, T.; Henquin, J. *British Journal of Pharmacology* **1989**, 98, 957.

<sup>126</sup> Jaroskova, L.; Van der Veken, L.; de Belser, P.; Diels, G.; de Groot, A.; Linders, J. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, 8063.

Peptidasa- IV (DPPIV) y se encuentran en estudios avanzados en clínica (Figura 61).<sup>127</sup>

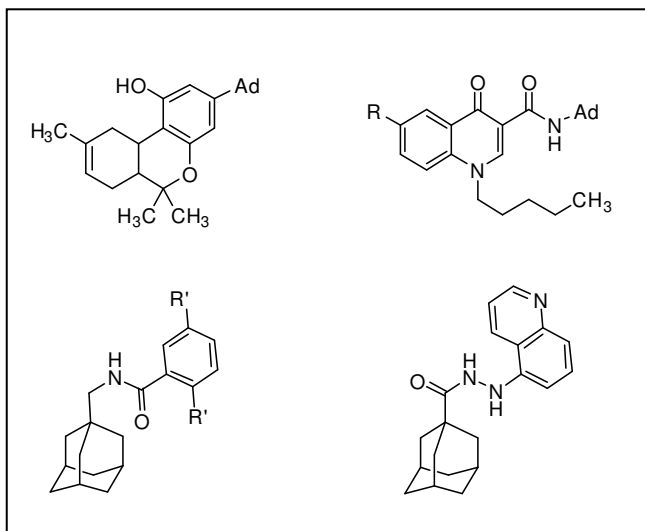


Figura 61. Derivados de adamantano con propiedades antiinflamatorias y analgésicas.

<sup>127</sup> Fleming, F. F.; Yao, L.; Ravikumar, P.; Funk, L.; Shook, B. C. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, 53, 7902.

### 3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como ya se ha indicado anteriormente el paracetamol aunque es usado ampliamente en clínica aún no ha sido dilucidado totalmente su mecanismo de acción. Además, se ha demostrado que su dosificación está limitada por la aparición de efectos adversos tras sobredosis como la toxicidad hepática y renal. Por tanto, en esta tesis se han preparado nuevos análogos sustituyendo el anillo de fenilo por la estructura de adamantano, con el fin de mejorar las propiedades farmacocinéticas manteniendo el efecto analgésico mostrado por el paracetamol (Figura 62).

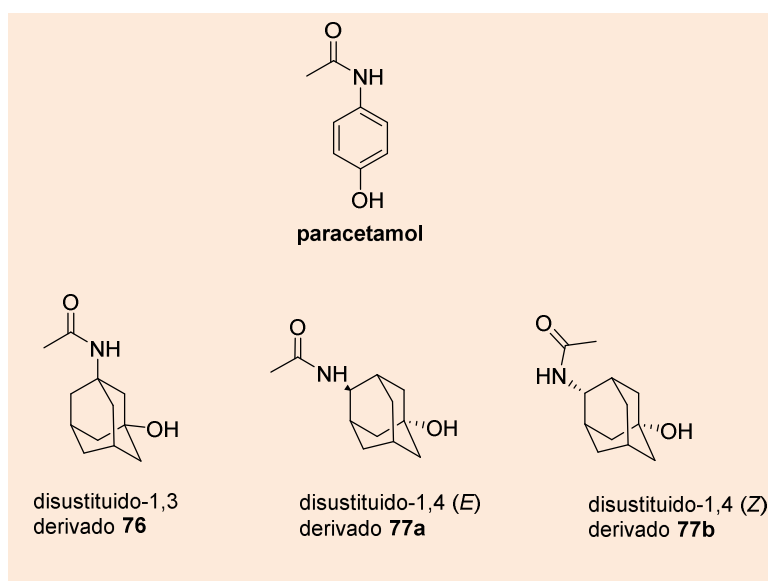


Figura 62. Paracetamol y derivados de adamantano sintetizados.

Esta estructura hidrocarbonada proporciona un aumento de lipofilia lo que facilita su paso a través de las membranas celulares. Por otro lado, se ha demostrado

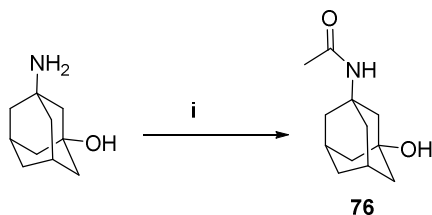
que es una estructura “biocompatible”, es decir, se ha observado que tras su metabolismo no se observan efectos tóxicos por su acumulación. Esta propiedad permitiría su uso en tratamientos crónicos, y además, diversos estudios sobre diferentes derivados de adamantano como fármacos han demostrado que sus metabolitos son eliminados perfectamente, siendo esto una ventaja frente a los efectos adversos mostrados tras la eliminación de metabolitos bioactivos.

Además de la síntesis se ha llevado a cabo ensayos farmacológicos *in vivo* para determinar la capacidad analgésica de los derivados **76**, **77a** y **77b**. Por otro lado, se han realizado los estudios *in vitro* en diferentes dianas terapéuticas relacionadas con el dolor como: los receptores cannabinoides (CB1, CB2), COX-1 y COX-2 y canales iónicos.

### 3.2.1. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ADAMANTANO

#### *Síntesis de N-hidroxiadamantan-1-il acetamida (76)*

El compuesto **76** se obtuvo por reacción de acetilación del 3-amino-1-adamantol con anhídrido acético a 0 °C en piridina a 0 °C (Esquema 20).



Reactivos y condiciones: (i) anhídrido acético, piridina, t.a.

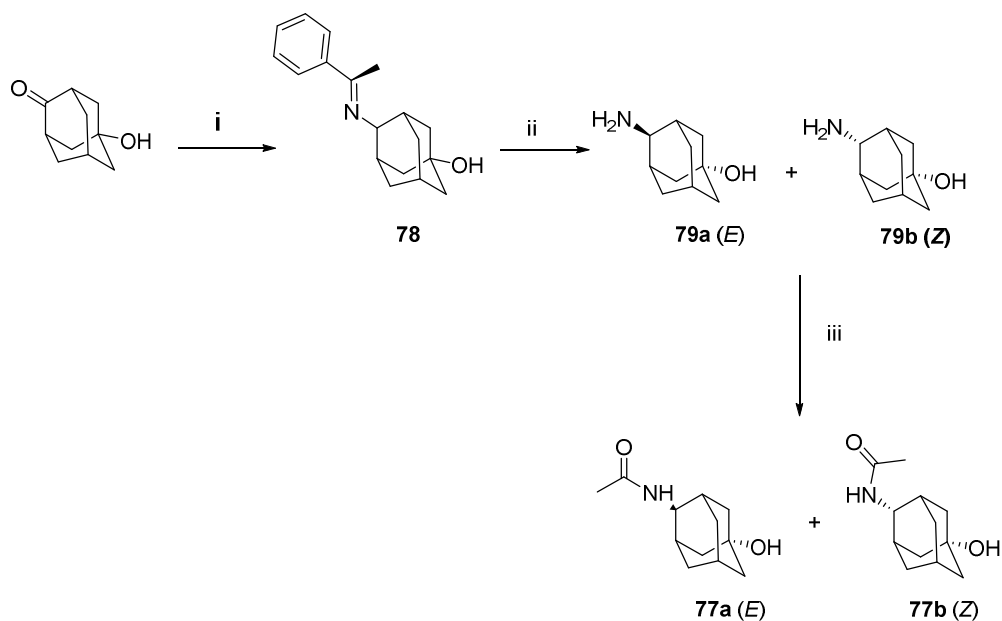
Esquema 20. Síntesis del compuesto **76**.

*Síntesis de los isómeros E y Z- N-( 5-hidroxiadamantan-2-il) acetamida (77a y 77b)*

Los compuestos **77a** y **77b** se sintetizaron siguiendo el Esquema 21 de síntesis. Esta ruta es una modificación de la propuesta por Linders y colaboradores,<sup>128</sup> en la que los derivados se obtienen tras una reacción de aminación reductora. Los derivados **77a** y **77b** se obtuvieron tras 3 etapas de síntesis. Inicialmente se hizo reaccionar el enantiómero puro de la S- $\alpha$ -metilbencilamina con 5-hidroxi-2-adamantanona a reflujo de etanol. A continuación, se llevó a cabo la hidrogenación completa del derivado **78** en presencia del catalizador Pd/C 10 %, obteniéndose la mezcla de los isómeros **79a** y **79b**. La última etapa consiste en la acetilación de la mezcla en las condiciones experimentales descritas anteriormente, pero sustituyendo el disolvente piridina por H<sub>2</sub>O. La mezcla de isómeros **77a** y **77b** se obtuvo en una proporción 7:3, siendo el isómero *E* mayoritario.

---

<sup>128</sup> Jaroskova, L.; Van der Veken, L.; de Belser, P.; Diels, G.; de Groot, A.; Linders, J. *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, 8063.



Reactivos y condiciones: (i) *S*-α-metilbencilamina, EtOH, reflujo, 12h; (ii)  $H_2$ , 10% Pd-C, THF, 15 psi, t.a; (iii) anhídrido acético,  $H_2O$ , 0 °C-t.a.

Esquema 21. Síntesis de los compuestos **77a** y **77b**.

La mezcla es muy difícil de separar por lo que se ha usado como tal para la asignación estructural y los ensayos farmacológicos, si bien finalmente fue posible aislar una pequeña cantidad de cada isómero puro por cromatografía automatizada HPLC semipreparativa. Por tanto, se llevó a cabo un estudio teórico con el programa GIAO/B3LYP/6-311+G(d,p) para el cálculo de los valores de  $^1H$  y  $^{13}C$  RMN de la mezcla de isómeros **77a** y **77b**. La asignación de los protones axiales y ecuatoriales se ha realizado por analogía a los cálculos de GIAO (Tabla 19).



Compuesto	77a (E) exp.	77a (E) calc.	77b (Z) exp.	77b (Z) calc.
C1	66.0	69.2	66.0	69.3
C2	45.2	48.2	39.8	43.8
C3	34.0	38.3	36.3	39.0
C4	52.9	53.9	52.4	53.6
C5	34.0	37.8	36.3	39.2
C6	30.5	32.8	34.9	37.2
C7	29.9	33.6	29.8	33.4
C8	46.3	43.8	46.0	43.8
C9	45.2	46.8	39.8	43.0
C10	30.5	33.5	34.9	38.7
C11	169.1	163.9	169.2	163.9
C12	23.4	21.9	23.3	21.9
H2eq	1.63	1.78	1.82	1.70
H2ax	1.55	1.53	1.32	1.18
H3	1.86	1.72	1.95	1.78
H4	3.72	3.95	3.62	3.83
H5	1.86	1.96	1.95	2.08
H6eq	1.82	1.42	1.56	1.64
H6ax	1.95	1.68	1.56	1.73
H7	1.95	1.90	1.95	1.88
H8eq	1.56	1.74	1.56	1.70
H8ax	1.56	1.75	1.56	1.70
H9eq	1.55	1.55	1.32	1.42
H9ax	1.63	1.75	1.82	1.57
H10eq	1.82	1.47	1.56	1.71
H10ax	1.95	1.55	1.56	1.68
CH <sub>3</sub>	1.82	1.71	1.82	1.71

Tabla 19. Desplazamientos químicos  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  RMN experimental y calculada [GIAO/B3LYP/6-311+++G(d,p)] de los compuestos **77a** y **77b**.

Finalmente, como se observa en la Figura 63 se han llevado a cabo los cálculos teóricos para determinar la energía de ambos estereoisómeros, observándose que el isómero *E* es más estable que el *Z* (0.2 KJ/mol).

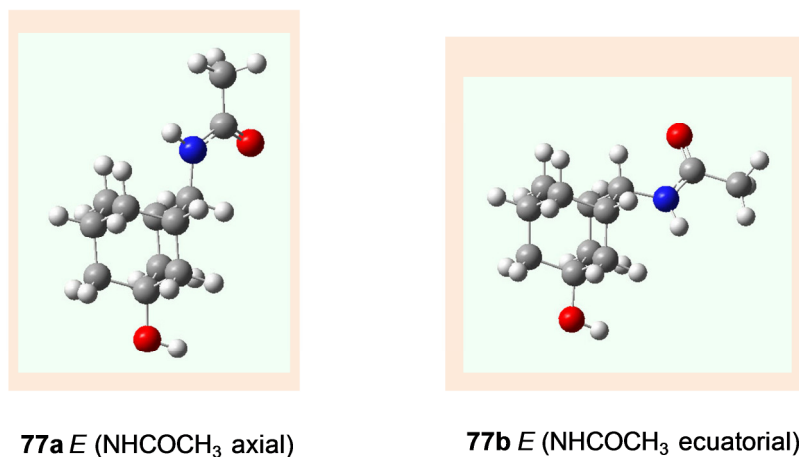


Figura 63. Estereoisómeros *E* y *Z* del compuesto **77**.

### 3.2.2. FARMACOLOGÍA

Se han llevado a cabo estudios *in vivo* para determinar la capacidad analgésica de los derivados sintetizados y una serie de estudios *in vitro* para estudiar el mecanismo de acción de los derivados sintetizados.

#### Ensayos *in vivo*.

##### *Estimulación química. Test de contorsiones.*

Para el estudio del dolor *in vivo* existen diferentes ensayos clasificados en función del tipo de estímulo que se utilice: químico, mecánico, eléctrico y térmico. En el diseño del ensayo es importante la elección del sexo y edad del

animal, al igual que evitar las situaciones de estrés ya que se ha demostrado que estos factores provocan diferencias comportamentales e incluso, pueden modificar el umbral de respuesta. El test de contorsiones consiste en administrar una solución irritante por vía intraperitoneal a un ratón; éste responde con un movimiento estereotipado que consiste en contracciones de musculatura abdominal, estiramientos de las patas traseras y reducción de la actividad motora. Como solución irritante se pueden utilizar fenilbenzoquinona, aceticolina, ATP y ácido acético, entre otras. El test de contorsiones no es un test muy selectivo pero si proporciona una buena correlación entre la dosis eficaz 50 ( $ED_{50}$ ), es decir la dosis necesaria para conseguir el 50 % del efecto máximo, en rata y las dosis analgésicas en humanos.

Este estudio se ha llevado a cabo en la Unidad de Farmacología de la URJC y se ha utilizado las siguientes condiciones experimentales: el estímulo es inducido por ácido acético al 2 % y la duración del test es de 10 min ( tras 5 min de latencia desde la administración del acético). El paracetamol y la morfina son utilizados como fármaco de referencia. Cuando el paracetamol se administra de forma intraperitoneal induce un leve efecto antinociceptivo dosis-dependiente, y para llevar a cabo un estudio comparativo se lleva a cabo la administración i.p. de morfina (5 mg/Kg), el cual es un analgésico opioide muy utilizado en clínica. Tras la administración del derivado **76** y la mezcla de isómeros **77a** y **77b** se observó que ambos son capaces de inducir un efecto antinociceptivo dosis-dependiente estadísticamente significativo. El derivado **76** disminuye el número

de contorsiones en el animal a unas dosis elevadas de compuesto 200 y 500 mg/kg (Figura 64) y muestra un efecto antinociceptivo similar al paracetamol.

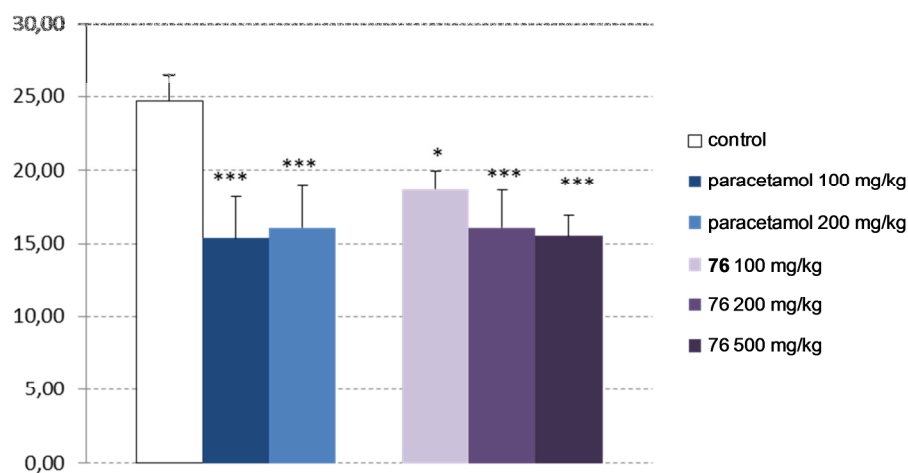


Figura 64. Test de contorsiones del compuesto **76**.

Como se observa en la Figura 65 la mezcla de isómeros **77a** y **77b** muestra una mayor capacidad analgésica a todas las dosis ensayadas, e incluso a la dosis máxima de 500 mg/kg exhibe una potencia mayor que paracetamol y similar a la mostrada por la morfina (5 mg/kg).

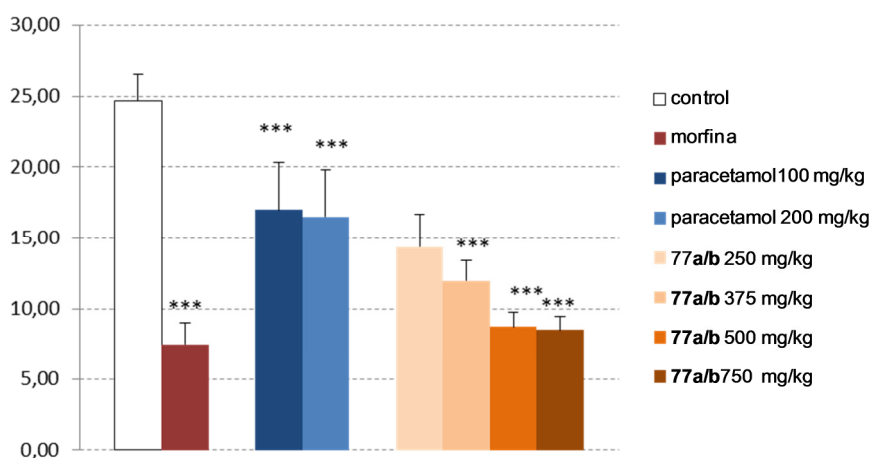


Figura 65. Test de contorsiones de la mezcla **77a** y **77b**.

### Ensayos in vitro

#### *Ensayos de desplazamientos de radioligando.*

Como se indicó anteriormente, se ha relacionado el mecanismo de acción del paracetamol con el sistema endocannabinoide; por ello, se han llevado a cabo ensayos biológicos para evaluar la posible afinidad de los derivados **76**, **77a** y **77b** por los receptores CB1 y CB2. También, se han evaluado el paracetamol y cada uno los precursores respectivamente. Como se observa en la Tabla 20, el fármaco analgésico, paracetamol, y los precursores no producen desplazamiento del radioligando; sólo la mezcla de isómeros **77a** y **77b** presenta afinidad por el receptor CB2, con una  $K_i$  en el rango micromolar. El paracetamol no presenta una afinidad significativa por los receptores cannabinoides, esto confirma los resultados publicados anteriormente; de hecho, la participación del sistema

endocannabinoide en el mecanismo de acción de este analgésico se ha considerado indirecta.

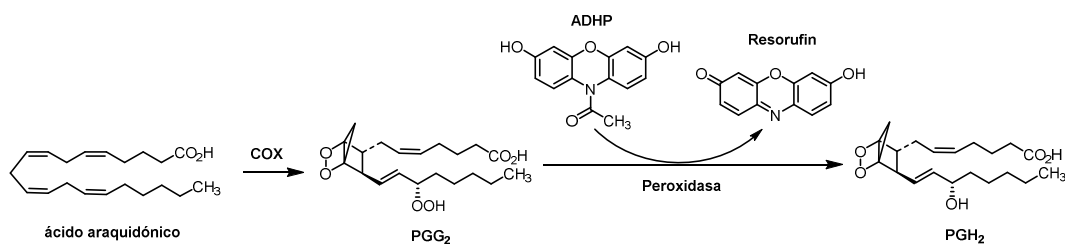
Compuesto	K <sub>i</sub> CB1 (40 μM)	K <sub>i</sub> CB2 (40 μM)
Paracetamol	>40	>40
<b>76</b>	>40	>40
<b>79a/79b</b>	>40	>40
<b>77a/77b</b>	>40	8.1±2.9

Tabla 20. Valores de K<sub>i</sub> CB1 y CB2 [μM]±SEM de los compuestos **76**, **79a/79b** y **77a/77b**.

Finalmente se realizó un ensayo *in vivo* para confirmar la posible relación de los isómeros **77a** y **77b** con los receptores cannabinoides. El compuesto **77a/77b** se administró i.p. y tras 30 min se administraron los ligandos antagonistas AM251 (3 mg/Kg) y AM630 (1 mg/kg) (CB1 y CB2 selectivos, respectivamente). Tras 30 min de ensayo los resultados demostraron que ninguno de los antagonistas utilizados bloquean el efecto analgésico del compuesto **77a/77b** lo que indica que la inducción de la antinocicepción no transcurre por mecanismos cannabinoides.

### Ensayos COX

Los ensayos de inhibición de la enzima COX se han llevado a cabo en IQM. La ciclooxigenasa (COX) es una enzima bifuncional que muestra actividad COX y actividad peroxidasa. Como se observa en el Esquema 22, la conversión de ácido araquidónico (AA) en prostaglandinas  $H_2$  ( $PGH_2$ ) consiste en dos etapas mediadas por las dos actividades de la enzima. De las dos isoformas totalmente definidas de la COX, es la COX-2 la responsable de la biosíntesis de prostaglandinas (PGs) bajo condiciones inflamatorias.



Esquema 22. Conversión en dos etapas del ácido araquidónico en  $PGH_2$ .

El ensayo biológico realizado se centra principalmente en la segunda etapa de síntesis, actividad peroxidasa de la enzima. Tras la reacción entre  $PGG_2$  y ADHP (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) se forma resorufin, el cual es un compuesto altamente fluorescente. Tras determinar la concentración de resorufin por medida de fluorescencia se determina la capacidad inhibitoria de los derivados sintetizados. En los ensayos se utiliza el paracetamol como fármaco de referencia. Como se observa en la Tabla 21 los derivados **76**, **79a/b** y **77a/b** no inhiben COX-1 ni COX-2 a una concentración 10  $\mu M$ .

Compuesto	COX-1 (IC <sub>50</sub> μM)	COX-2 (IC <sub>50</sub> μM)
Paracetamol <sup>b</sup>	-	7.08 ±1.62
<b>76</b>	>10	>10
<b>79a/79b</b>	>10	>10
<b>77a/77b</b>	>10	>10

Tabla 21. Valores de IC<sub>50</sub> COX-1 y COX-2 del paracetamol y los compuestos **76**, **79a/b** y **77a/b**.

#### *Ensayos en receptores de potencial transitorio (TRP)*

Estos estudios se han realizado en el Instituto de Biología Molecular y Celular de la Universidad Miguel Hernández. Debido a que los canales termoTRP tienen un papel fundamental en la transducción del dolor,<sup>129</sup> se ha llevado a cabo este ensayo para determinar si la actividad analgésica de **77a/b** se puede deber a la inhibición de alguno de estos canales. De las 6 subfamilias de TRP se han seleccionado TRPM (“melastatina”), TRPV (“vanilloide”) y TRPA (“anquirina”) para llevar a cabo los ensayos al considerarse los más validados en la señalización del dolor.

Como se observa en la Figura 66, sólo el canal TRPA1 es bloqueado con un 85 % de selectividad a la concentración de **77a/77b** ensayada (50 μM). La curva dosis-respuesta muestra que el compuesto **77a/77b** presenta una IC<sub>50</sub> de 2.6

<sup>129</sup> Zheng, J. *Comprehensive Physiology* **2013**.



$\mu\text{M}$ , lo que indica que el compuesto muestra una actividad antagonista del canal TRPA1 moderada, y una interesante selectividad frente a los otros canales.

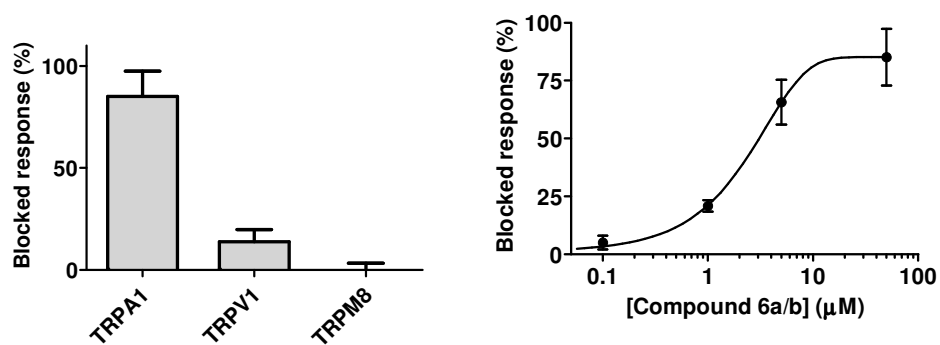


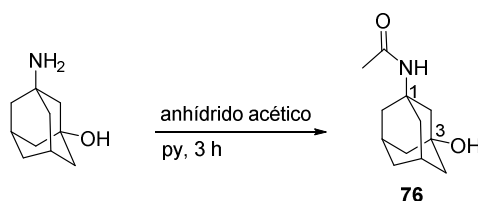
Figura 66. Ensayos fluorométricos del compuesto **77a/b**.

### 3.3. CONCLUSIONES

- Se han preparado análogos de paracetamol en los que el anillo aromático del acetil-p-aminofenol se ha sustituido por un resto adamantilo.
- La evaluación biológica en ratón ha mostrado efectos analgésicos “in vivo” comparables o superiores a los del paracetamol y que no transcurren ni por mecanismos cannabinoides ni por inhibición de COX.
- Todos estos resultados indican que el TRPA1 es una diana para el compuesto **77a/b**, lo que sugiere que este receptor juega un papel en el dolor visceral.

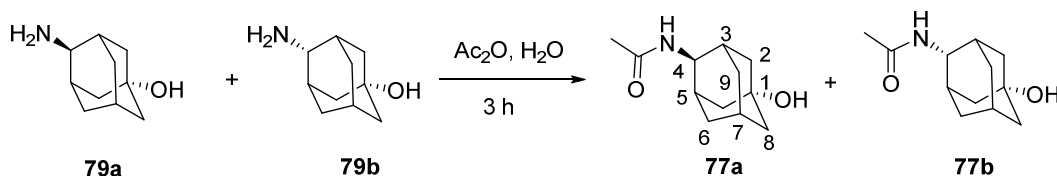
### 3.4. PARTE EXPERIMENTAL

#### Síntesis de *N*-(3-hidroxiadamantan-1-il) acetamida (**76**)

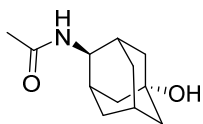


A una disolución de 3-amino-1-adamantanol (0.6 g, 3.7 mmol) en piridina (7.0 mL) se añade anhídrido acético (0.45 mL) a 0 °C, apareciendo un precipitado blanco. La mezcla de reacción se mantiene a 0 °C durante 1 h, y posteriormente durante 2 h a t.a. Tras el tiempo de reacción, la mezcla se acidifica con HCl 1 N y se realiza una extracción múltiple con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4x20 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre MgSO<sub>4</sub> y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose el compuesto **76** como un sólido blanco (0.3 g, 45 %). P.f. 224.4 °C. Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 5-95 % en 6 min, tr= 3.03 min, m/z [M+H]<sup>+</sup>= 210. Análisis elemental teórico C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>; C, 68.87; H, 9.15; N, 6.69; experimental: C, 68.59; H, 9.27; N, 6.86. <sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 5.25 – 5.17 (s, 1H), 2.29 – 2.22 (m, 2H), 2.03 – 1.95 (m, 2H), 1.95 – 1.88 (m, 7H), 1.72 – 1.67 (m, 4H), 1.58 – 1.53 (m, 2H). <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.8 (CO), 69.6 (C-OH), 54.7 (C-NH), 49.5 (CH<sub>2</sub>), 44.5 (2CH<sub>2</sub>), 40.7 (2CH<sub>2</sub>), 35.3 (CH<sub>2</sub>), 31.0 (2CH), 25.0 (CH<sub>3</sub>).

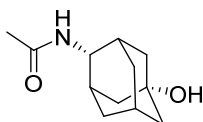
**Síntesis de isómeros (*E*)-*Z*-*N*-5-hidroxiadamantan-2-il acetamida (**77a**) y (**77b**)**



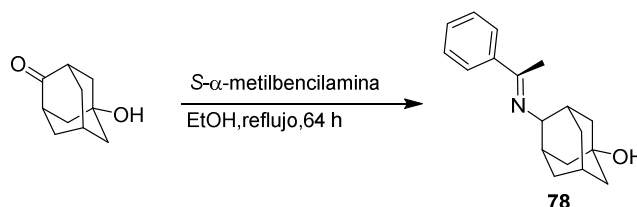
A una solución de los isómeros **79a** y **79b** (0.5 g, 3.0 mmol) en  $\text{H}_2\text{O}$  (8 mL) se adicionó anhídrido acético (0.4 mL, 3.5 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agita durante 1 h a 0 °C y posteriormente se mantiene a t.a. durante 2 h. A continuación, se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10x10 mL). Los extractos orgánicos se secan sobre  $\text{MgSO}_4$  y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose la mezcla de isómeros **77a** y **77b** como un sólido blanco (0.5 g, 77 %). P. f. 184 °C. Gradiente HPLC  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  2-30 % en 15 min, isómero *E* tr= 7.34 min, m/z  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 210$ ; isómero *Z* tr= 7.83 m/z  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 210$ . La mezcla de isómeros se separó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) semipreparativo: gradiente 2-30 % de A en B en 15 min, utilizando como fase móvil A:  $\text{CH}_3\text{CN}$  + 0.08 ácido fórmico y B:  $\text{H}_2\text{O}$  + 0.1 % ácido fórmico, a un flujo de 9 mL/min y con detección en continua a longitudes de onda de 190-400 nm. Análisis elemental teórico  $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ : C, 68.87; H, 9.15; N, 6.69. Experimental C, 68.70; H, 9.35, N, 6.39.

Isómero-*E* (**77a**)**77a**

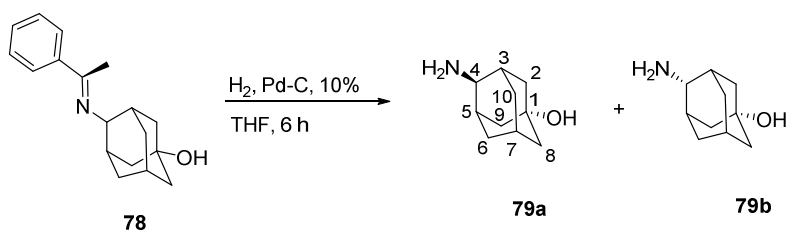
**77a** Sólido blanco (0.38 g, 60 %).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 3.75-3.70 (m, 1H, CHNH), 2.52-2.48 [m, 1H, CH (7)], 1.99-1.91 [m, 2H, CH (5,3)], 1.87-1.81 [m, 5H,  $\text{CH}_2$  (6,10),  $\text{CH}_3$ ], 1.67-1.60 [m, 2H,  $\text{CH}_2$  (2,9)], 1.60-1.53 [m, 4H,  $\text{CH}_2$ , (8,2,9)], 1.28-1.21 [m, 2H,  $\text{CH}_2$  (6,10)].  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 169.8 (CO), 69.6 (C-OH, C-1), 52.9 (C-NH, C-4), 46.3 ( $\text{CH}_2$ , C-8), 45.2 (2 $\text{CH}_2$ , C-2, 9), 34.0 (2CH, C-5,3), 30.5 (2 $\text{CH}_2$ , C-6,10), 29.9 (CH, C-7), 23.4 ( $\text{CH}_3$ , C-12).

Isómero-*Z* (**77b**)**77b**

**77b** sólido blanco (0.25 g, 40 %).  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 3.65-3.60 (m, 1H, CH-NH), 2.52-2.48 [m, 1H, CH(7)], 2.00-1.92 [m, 2H, CH (5,3)], 1.87-1.81 [m, 5H,  $\text{CH}_2$  (2,9)  $\text{CH}_3$ ], 1.60-1.53 [m, 6H,  $\text{CH}_2$ , (8,6,10)], 1.36-1.29 [m, 2H,  $\text{CH}_2$  (2,9)].  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 169.8 (CO), 69.6 (C-OH, C-1), 52.4 (C-NH, C-4), 46.0 ( $\text{CH}_2$ , C-8), 39.8 (2 $\text{CH}_2$ , C-2,9), 36.3 (2CH, C-5,3), 34.9 (2 $\text{CH}_2$ , C-6,10), 29.8 (CH, C-7), 23.3 ( $\text{CH}_3$ , C-12).

**Síntesis de 4-((*E*)-(1-pheniletiliden)amino)adamantan-1-ol (**78**)**

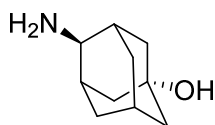
Se hace reaccionar 5-hidroxi-2-adamantanona (1.8 g, 10 mmol) y S- $\alpha$ -metilbencilamina (1.3 g, 10 mmol) a reflujo de EtOH absoluto (50 mL) durante 64 h. Tras el tiempo de reacción, el disolvente se elimina a presión reducida obteniéndose el compuesto **78** como un acetite amarillo (2.8 g, 95 %). Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 15-95% en 10 min, *t<sub>r</sub>* = 5.52 min, *m/z* [M+H]<sup>+</sup> = 270. El compuesto **78** no se purifica, y se utiliza como producto de partida de la siguiente etapa.

**Síntesis de *E* y *Z*-4-aminoadamantan-1-ol (**79a** y **79b**)**

A una disolución de la bencilimina **78** (0.33 g, 1.2 mmol) en THF (15 mL) se adiciona Pd-C 10 % (0.24 g) y la mezcla se hidrogena bajo condiciones de 15 psi y t.a durante 12 h. La mezcla de reacción se filtra y el disolvente se elimina a

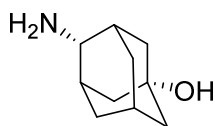
presión reducida, obteniéndose la mezcla de isómeros **79a** y **79b** como un sólido blanco puro (0.13 g, 67 %). P.f. 250 °C. Gradiente HPLC CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 2-30 % en 15 min, isómero *E* tr= 0.64 min, m/z [M+H]<sup>+</sup>= 168; isómero *Z* tr= 0.95 m/z [M+H]<sup>+</sup>=168. Análisis elemental teórico C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>NO: C, 71.81; H, 10.25; N, 8.37. Experimental C, 71.91; H, 10.40; N, 8.50.

#### ISÓMERO *E* (**79a**)



<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.02-2.98 (m, 1H, CH-NH<sub>2</sub>), 2.11-2.05 [m, 1H, CH(7)], 1.95-1.87 [m, 4H, CH<sub>2</sub>(6,10), CH(5,3)], 1.80-1.69 [m, 6H, CH<sub>2</sub> (8,2,9)], 1.41-1.34 [m, 2H, CH<sub>2</sub> (6,10)]. <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 69.6 (C-OH, C-1), 54.6 (C-NH, C-4), 45.9 (CH<sub>2</sub>, C-8), 45.1 (2CH<sub>2</sub>, C-2,9), 37.1 (2CH, C-5,3), 30.3 (2CH<sub>2</sub>, C-6,10), 29.5 (CH, C-7).

#### ISÓMERO *Z* (**79b**)



<sup>1</sup>H RMN ( 300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.87-2.85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 2.11-2.05 [m, 1H, CH(7)], 1.99-1.96 [m, 4H, (5, 3)], 1.80-1.69 [m, 2H, CH<sub>2</sub> (8)], 1.68-1.65 [m, 2H, CH<sub>2</sub>, (6, 10)], 1.63-1.58 [m, 2H, CH<sub>2</sub> (6, 10)], 1.53-1.46 [m, 2H, (2, 9)]. <sup>13</sup>C RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 69.6 (C-OH, C-1), 54.0 (C-NH, C-4), 45.7 (CH<sub>2</sub>, C-8), 38.9 (2CH<sub>2</sub>, C-2,9), 37.9 (2CH, C-5,3), 36.3 (2CH<sub>2</sub>, C-6,10), 29.8 (CH, C-7).

## PARTE EXPERIMENTAL FARMACOLÓGICA

### Ensayo fluorimétrico

Para los ensayos de fluorescencia, las células que expresan canales TRP (TRPV1-SH-SY5Y, células HEK-TRPM8 y TRPA1-IMR90) se sembraron en placas de 96 pocillos (Corning Incorporated, Corning, NY) a una densidad celular de 40.000 células 2 días antes del tratamiento. El día del tratamiento se reemplazó el medio con 100 L de la solución de carga de colorante Fluo-4 NW suplementado con probenecid 2,5 mM. A continuación, los compuestos disueltos en DMSO se añadieron a las concentraciones deseadas y las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO<sub>2</sub> durante 60 min.

La fluorescencia se midió con instrumentos apropiados usando una longitud de onda de excitación y de emisión, 485 y 535 nm, respectivamente. (Polarstar Omega BMG LAB tecnología). Antes de la estimulación con el agonista (10 mM capsaicina para TRPV1, 100 mM mentol para TRPM8 y 100 mM AITC para TRPA1) se registró una grabación de referencia de 4 ciclos. Se añadió el antagonista correspondiente (10 mM Rutenio Red de TRPV1 y TRPA1, 100 AMTB M durante TRPM8) para el bloqueo. Los cambios en la intensidad de fluorescencia se registraron durante 15 ciclos más. El DMSO se añadió a los pocillos de control a la concentración más alta utilizada en el experimento. El grado de bloqueo (%) de la actividad del canal TRP se calculó por:

$$\%Blockage = \frac{(F_0 - F_I)}{(F_{C0} - F_{CI})}$$



Donde:

$F_0$  es la fluorescencia después de la adición del agonista en presencia del compuesto.  $F_1$  es la fluorescencia antes de la adición del agonista en presencia del compuesto.  $F_{c0}$  es la fluorescencia después de la adición de agonista en ausencia del compuesto.  $F_{c1}$  es la fluorescencia antes de la adición de agonista en ausencia del compuesto. El Factor Z se calculó mediante las siguientes ecuaciones:

$$Z = 1 - \frac{3 * (SD_{max} + SD_{min})}{Mean_{max} - Mean_{min}}$$

Donde:

$Mean_{max}$  es la media de la fluorescencia máxima en presencia de agonista

$Mean_{min}$  es la media de la fluorescencia máxima en presencia de agonista y antagonista.

### **Ensayos de inhibición COX-1 y COX-2.**

Para determinar la actividad de COX-1 ovina aislada y COX-2 recombinante humano se usó un kit de ensayo (kit 700100) y llevó a cabo la metodología descrita por el fabricante (Cayman Chemical Company, USA).

### **Ensayos de analgesia *in vivo***

Los animales, CD-1 ratones machos (25-27 g), se redistribuyeron en grupos, dos de los cuales fueron utilizados como grupo de control. Los doce grupos restantes fueron tratados con paracetamol 100 y 200 mg/kg (dos grupos diferentes),

compuesto **76** (100, 200, 500 mg / kg) y el compuesto **77a/b** (250, 375, 500, 750 mg/kg). Un grupo adicional recibió morfina 5 mg/kg. Todos los fármacos fueron administrados por vía intraperitoneal (ip). Los ratones control fueron tratados con 10 mL/kg de solución salina.

Cada grupo estaba formado por 10 o 12 animales, los animales que presenten alteraciones del comportamiento fueron descartados anteriormente. Cada animal se usa sólo una vez. Un observador que no estaba al tanto de los diferentes tratamientos llevó a cabo la recogida de datos.

La prueba experimental utilizada fue el ensayo de retorcimiento ácido acético. El efecto de la i.p. la administración de 10 mL/kg de ácido acético (2 %) se midió mediante la cuantificación del número de contorsiones respuestas en los tres grupos de animales durante un período de 10 min. Las respuestas se midieron 30 min después de la administración del fármaco. Los animales utilizados fueron suministrados por el animalario de la Universidad Rey Juan Carlos. La temperatura ambiente se mantuvo a  $22 \pm 1$  °C. A 12 horas de luz - oscuridad ciclo se inició a las 8:00 am, a humedad constante. A todos los animales se les dio acceso libre a comida y agua.

Los protocolos experimentales utilizados en esta investigación fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad Rey Juan Carlos y se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (Zimmermann, 1983).

# Conclusiones finales

En esta tesis se han utilizado diferentes aproximaciones para preparar nuevos fármacos con potencial aplicación en el síndrome metabólico y en el dolor. Se han empleado estrategias de diseño “de novo”, partiendo del conocimiento de una diana terapéutica (structure based drug design), pero, también, se han utilizado fármacos ya conocidos tanto para preparar combinaciones de los mismos, como para sintetizar análogos (analogue based drug design).

En el primer capítulo, se han preparado nuevos ligandos de un receptor nuclear, PPAR, mediante un diseño basado en el conocimiento de su farmacóforo, así como en su estructura tridimensional. Se han conseguido nuevos agonistas que han mostrado interesante actividad tanto “in vivo” como “in vitro”. Además, se han sintetizado ligandos duales, capaces de activar no solo el PPAR si no también, el receptor cannabinoide, perteneciente a los receptores acoplados a proteína G. Estos compuestos poseen buena afinidad por ambos tipos de dianas terapéuticas.

En el segundo capítulo, se han combinado, en forma de líquidos iónicos, estructuras de fármacos bien conocidos. Se han puesto a punto los procesos de síntesis y se han caracterizado por técnicas espectroscópicas y calorimétricas. Dos derivados de la metformina han mostrado interesantes propiedades cristalográficas y farmacológicas.

Finalmente, en el capítulo tercero, se han preparado adamantil análogos del paracetamol, que tienen efectos analgésicos “in vivo” comparables a los del fármaco de partida y cuyo mecanismo de acción parece involucrar una nueva diana terapéutica.